



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares

**PARTICIPACIÓN DE LA VÍA TRANSDUCCIONAL
IP₃-RECEPTOR DE IP₃-CALCIO EN LA ACCIÓN DE
INSULINA EN CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

CÉSAR ALONSO VÁSQUEZ TRINCADO

Profesor Patrocinante:
Dr. Sergio Lavandero G.

Directores de Memoria:
Dr. Sergio Lavandero G.
Dr. Ariel Contreras F.

Santiago de Chile, 2011

*Esta memoria se realizó en el Laboratorio de Transducción de Señales del Centro Estudios Moleculares de la Célula y del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile y contó con el financiamiento de los Proyectos **FONDECYT 1080436** y **FONDAP 15010006**, Investigador Responsable: Dr. Sergio Lavandero G.*

A Elba, Silvia, Santiago y Carolina

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	4
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	7
ABREVIATURAS	8
RESUMEN.....	9
SUMMARY	11
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. Insulina	13
1.2. Receptor de insulina y su sistema de transducción	14
1.3. Transportador de glucosa GLUT4	17
1.4. Calcio como segundo mensajero	18
2. HIPÓTESIS	21
3. OBJETIVO GENERAL	21
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1. Reactivos.....	22
5.2. Cultivo Celular.....	23
5.3. Captura de glucosa.....	24
5.4. Detección densitométrica de GLUT4-myc en superficie	25
5.5. Obtención de extractos proteicos y cuantificación de proteínas	27
5.6. Western blot	28

5.7. Inmunofluorescencia Indirecta	29
5.8. Transfección de DNA plasmidial.....	30
5.9. Expresión de resultados y análisis estadísticos	30
6. RESULTADOS	31
6.1. Caracterización de la línea celular L6-GLUT-myc.....	31
6.2. Participación del calcio extracelular e intracelular en la captación inducida por insulina	33
6.3. Participación del calcio intracelular en la translocación del transportador inducida por insulina.....	37
6.4. Participación del calcio extracelular e intracelular en la activación de Akt dependiente de insulina	42
6.5. Detección subcelular de IP ₃ R y RyR en células musculares esqueléticas L6-GLUT4-myc	45
6.6. Participación de IP ₃ R y RyR en fosforilación de Akt inducida por insulina	47
6.7. Participación de reservorios específicos de calcio en la translocación del transportador GLUT4 inducida por insulina	49
6.8. Participación de reservorios específicos de calcio dependiente de IP ₃ R y RyR en la captación de glucosa inducida por insulina	54
7. DISCUSIÓN.....	57
8. CONCLUSIONES	67
9. BIBLIOGRAFÍA.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efectos de insulina sobre el transportador GLUT4-myc	32
Figura 2. Participación del calcio extracelular en la incorporación de glucosa inducida por insulina	34
Figura 3. Participación del calcio intracelular en la incorporación de glucosa inducida por insulina	36
Figura 4. Participación del calcio intracelular en la translocación del transportador GLUT4-myc inducida por insulina	39
Figura 5. Participación del calcio intracelular en la translocación del transportador GLUT4-myc y remodelamiento de actina inducido por insulina	41
Figura 6. Participación del calcio extracelular e intracelular en la activación de IR, Akt y ERK 1/2 dependiente de insulina	44
Figura 7. Presencia de IP ₃ R y RyR en miotubos L6-GLUT4-myc.....	466
Figura 8. Participación de IP ₃ R y RyR en la activación de IR, Akt y ERK 1/2 inducida por insulina	48
Figura 9. Participación de reservorios específicos de calcio en la translocación del transportador GLUT4-myc inducida por insulina	51
Figura 10. Participación de IP ₃ R en la translocación del transportador GLUT4-myc y remodelamiento de actina dependiente de insulina.....	53
Figura 11. Participación de IP ₃ R y RyR en la incorporación de glucosa inducida por insulina.....	56
Figura 12. Modelo propuesto para la participación de la vía IP ₃ -IP ₃ R-Ca ²⁺ en la acción de insulina en células musculares esqueléticas.....	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades funcionales de las isoformas del receptor de IP ₃	20
--	-----------

ABREVIATURAS

ADP:	Adenosin difosfato
ATP:	Adenosin trifosfato
Bp:	BAPTA-acetoximetiléster
BSA:	Albúmina de suero bovino
Ca ²⁺ :	Calcio
[Ca ²⁺]:	Calcio intracelular
CaM:	Calmodulina
CaMKII:	Proteína kinasa II dependiente de CaM
Cit B:	Citocalasina B
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
EGTA:	Ácido etilenglicoltetraacético
ERK:	Proteína kinasa regulada extracelularmente
h:	Hora
HEPES:	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etansulfónico
IGF-1:	Factor de crecimiento análogo a insulina tipo 1
Ins:	Insulina
IP ₃ :	Inositol 1,4,5 - trifosfato
IP ₃ R:	Receptor de IP ₃
IR:	Receptor de Insulina
IRS:	Sustrato del receptor de Insulina
MAPK:	Proteína kinasa activada por mitógenos
mTOR:	Blanco en mamíferos de rapamicina
min:	Minuto
OPD:	O-fenilenediamina
PBS:	Tampón fosfato salino
PDK1:	Proteína kinasa dependiente de 3-fosfoinositidos
PI3K:	Fosfatidilinositol 3-kinasa
PIP ₂ :	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PIP ₃ :	Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato
PLC:	Fosfolipasa C
PVDF:	Polifluoruro de vinilideno
Rictor:	Compañero de mTOR insensible a rapamicina
Ry:	Ryanodina
RyR:	Receptor de ryanodina
RPM:	Revoluciones por minuto
SDS:	Dodecilsulfato de sodio
SFB:	Suero fetal bovino
TEMED:	Tetrametiletilenediamina
U-73122:	Inhibidor de PLC
Xe B:	Xestospongina B
WT:	Tipo silvestre
Ly-294002	Inhibidor de PI3K

RESUMEN

El músculo esquelético, uno de los principales tejidos sensibles a insulina, es el principal encargado del mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, disponiendo de alrededor de un 80% de la glucosa circulante postprandial, mediante la acción de insulina. El principal encargado de realizar esta acción, es el transportador de glucosa GLUT4, cuya translocación a la membrana plasmática es mediada por esta hormona. Este trabajo se centra en definir el papel del calcio (Ca^{2+}), importante mensajero intracelular, en el transporte de glucosa inducido por insulina. Para ello, se utilizó la línea celular de músculo esquelético L6-GLUT4-myc que expresa establemente un epítotope myc en el transportador de glucosa GLUT4. Se obtuvo como resultado que EGTA, un quelante de calcio extracelular, no alteró la fosforilación de Akt, como tampoco la translocación del GLUT4, y por tanto, el transporte de glucosa inducido por insulina. En contraste, BAPTA-AM, un quelante de calcio intracelular, disminuyó significativamente, la fosforilación de Akt y la translocación del transportador de glucosa GLUT4 dependiente de insulina. Conjuntamente, la reorganización de la actina cortical, un evento necesario para la translocación del transportador GLUT4, también se alteró por la ausencia de calcio intracelular. Por otro lado, la expresión transitoria de una proteína tampón de calcio como es parvalbúmina, también disminuyó la translocación del GLUT4. Además, BAPTA-AM disminuye el transporte de glucosa, de una manera dependiente de la concentración.

Específicamente, el bloqueo farmacológico del receptor de IP₃, por xestospongina B redujo la fosforilación de Akt. Por el contrario, Ryanodina, usada como bloqueador del receptor de ryanodina, no afectó la fosforilación de Akt. Xestospongina B y U-73122, un inhibidor de PLC, disminuyeron significativamente la translocación del transportador GLUT4 y el transporte de glucosa dependiente de insulina. Ryanodina ejerció una leve caída en estos parámetros. En conclusión, el Ca²⁺ es un activo regulador de la actividad de Akt, modulando la translocación del transportador GLUT4 y el transporte de glucosa inducidos por insulina. Específicamente, la liberación de calcio a partir de los reservorios dependientes del receptor de IP₃, regula el transporte de glucosa dependiente de insulina, en el músculo esquelético.

SUMMARY

The skeletal muscle, a major insulin-sensitive tissue, is responsible for the maintenance of glucose homeostasis, accounting for ~80% of post-prandial circulating glucose, primarily through the action of insulin. GLUT4 is the major glucose transporter, whose translocation to plasma membrane is mediated by this hormone. This work focuses on defining the role of calcium (Ca^{2+}), important intracellular messenger, on the insulin-induced glucose transport in skeletal muscle cells. To this end, the skeletal muscle cell line L6-GLUT4-myc was used. This cell line stably expresses a c-myc epitope on glucose transporter GLUT4. The results showed that the extracellular calcium chelator EGTA did not alter Akt phosphorylation, nor the GLUT4 translocation, and therefore, the insulin-induced glucose transport. In contrast, the intracellular calcium chelator BAPTA-AM significantly decreased Akt phosphorylation and the insulin-dependent GLUT4 translocation. Together, cortical actin reorganization, an event required for GLUT4 transporter translocation, is also altered in the absence of intracellular calcium. On the other hand, the transient expression of the calcium buffer protein parvalbumin also decreased GLUT4 translocation. In addition, BAPTA-AM diminished glucose transport, in a concentration dependent manner. The pharmacological blockade of IP_3 receptor by xestospongin B, reduced Akt phosphorylation. By contrast, Ryanodine, used as a ryanodine receptor antagonist, did not affect Akt phosphorylation. Xestospongin B and U-73122, a phospholipase C inhibitor, significantly decreased insulin-dependent

GLUT4 translocation and glucose transport. Ryanodine slightly decreased both parameters.

In conclusion, Ca^{2+} is an active regulator of Akt activity, modulating GLUT4 and glucose transport. Specifically, calcium release from IP_3 receptor-dependent storages regulates insulin-dependent glucose transport in skeletal muscle cells.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Insulina

Insulina es una hormona de naturaleza peptídica, cuya secuencia primaria fue determinada por Sanger *et al.* en el año 1954. Se describió como una estructura de 51 aminoácidos (equivalente a una masa molecular de 5,8 kDa), que consta de dos cadenas peptídicas A y B, de 21 y 30 residuos de aminoácidos, respectivamente [1]. Estas cadenas están unidas por dos puentes disulfuro entre los residuos de CysA7-CysB7 y CysA20-CysB19 [2]. También existe un puente disulfuro entre los residuos CysA6-CysA11 de la cadena A, el cual es esencial para estabilizar la cadena A y por ende, conservar la potencia de la hormona [3]. Insulina es secretada en los islotes de Langerhans localizados en el páncreas, específicamente en las células β , mediante un mecanismo que comprende la biosíntesis de preproinsulina en el retículo endoplásmico, procesamiento de proinsulina a insulina madura en gránulos de secreción de insulina, translocación de los gránulos hacia una región específica de la membrana plasmática y finalmente exocitosis de la insulina via acoplamiento y posterior fusión de los gránulos con la membrana plasmática [4]. La secreción de insulina hacia el torrente sanguíneo es controlada principalmente por concentraciones elevadas de glucosa en el plasma, mediante un mecanismo que involucra en primer lugar, la entrada de la glucosa a través del transportador de glucosa GLUT2 [5].

Posteriormente, la glucosa es fosforilada por glucocinasa, la primera enzima en la vía glicolítica en las células . La generación de ATP por la glicólisis, incrementa la razón intracelular ATP/ADP [6]. El ATP se une a canales de K_{ATP} , provocando el cierre de estos canales, lo que resulta en la depolarización de la célula [7]. Cuando el potencial de membrana de la célula , alcanza -30 a -40 mV, los canales de calcio sensibles a voltaje se abren, conduciendo a un influjo de iones calcio hacia el citoplasma [8]. Finalmente, el aumento del calcio intracelular gatilla la exocitosis de los gránulos que contienen insulina. La vida media de insulina en el plasma es alrededor de 5 min, lo que permite un estricto control de su actividad, en los diversos tejidos y subtipos celulares [9]. Insulina es una hormona que regula activamente el metabolismo energético, ya sea de carbohidratos, lípidos y proteínas. Además, promueve el crecimiento y diferenciación celular, a través de sus efectos mitogénicos.

1.2. Receptor de insulina y su sistema de transducción

Insulina, a través de su receptor de membrana, regula el crecimiento, la sobrevivencia y la diferenciación celular, a través de la vía transduccional Ras-MAPK y el transporte de glucosa, principalmente a través de la ruta de señalización PI3K-Akt.

Específicamente, el receptor de insulina (IR) es una heterotetrámero que se compone de dos subunidades extracelulares y dos subunidades transmembrana , que se encuentran unidas mediante puentes disulfuro [10].

La cadena α y 194 residuos pertenecientes a la cadena β forman la porción extracelular del IR. En la cadena β , hay una secuencia transmembrana simple y un dominio citoplasmático de 403 residuos, que contienen la actividad tirosina kinasa [11]. La unión del ligando (insulina) a la subunidad α estimula la actividad tirosina kinasa intrínseca de la subunidad β del receptor de insulina, lo cual lleva a la transfosforilación de las subunidades β , lo cual conduce a un cambio conformacional y un incremento gradual en la actividad tirosina kinasa [12]. A diferencia de otros receptores con actividad tirosina kinasa, los cuales se conectan directamente con sus efectores, el receptor de insulina posee proteínas de andamiaje que median la unión a sus efectores intracelulares, las cuales son llamadas IRS (sustratos del receptor de insulina). Se conocen al menos 11 sustratos de IR y del receptor de IGF-1 (IGF-1R). De los 11 anteriores, 6 han sido denominados como IRS 1-6 y tienen diferente expresión y función en los tejidos. Las proteínas IRS tienen dominios de homología pleckstrina (dominios PH) y dominios de unión a fosfotirosinas (dominios PTB). Los dominios PH, median la unión de estas proteínas a fosfolípidos de membrana. Por su parte, los dominios PTB, participan en la unión a residuos específicos de fosfotirosinas. Los dominios PTB dan cuenta de la gran afinidad de estas proteínas por el IR. Después de la fosforilación de estos sustratos por el IR, se unen a moléculas intracelulares que contienen dominios SH2 (dominios de alrededor de 100 aminoácidos que se unen a residuos de fosfotirosinas) como es fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K).

PI3K es un heterodímero compuesto de una subunidad regulatoria y una subunidad catalítica [13]. La activación de la subunidad catalítica depende de la interacción de dos dominios SH2 ubicados en la subunidad regulatoria con motivos específicos situados en los IRS.

PI3K activa reguladores críticos en la señalización de insulina, catalizando la formación de un segundo mensajero lipídico, PIP₃. Las proteínas que contienen dominios PH pueden unirse a PIP₃, ser localizadas en la misma región con otras proteínas. Entre éstas, se encuentra PDK1, responsable de la activación de Akt/PKB, un nodo importante en la señalización de insulina. PDK1 fosforila los loops de activación de Akt en el residuo Thr308 [14]. Sin embargo, Akt requiere una segunda fosforilación en el residuo Ser473 para conseguir su activación completa. Esta fosforilación es llevada a cabo por el complejo mTOR-riCTOR [15]. Últimamente, se ha descubierto que Akt requiere ubiquitinación por la E3 ligasa TRAF6, para alcanzar su máxima actividad [16].

Akt es una proteína serina/treonina kinasa que media la mayoría de los efectos metabólicos de insulina. Akt regula el transporte de glucosa, fosforilando e inhibiendo la proteína AS160 (sustrato de Akt de 160 kDa) [17]. Este paso gatilla la activación de las GTPasas pequeñas de la familia Rab que están involucradas en la reorganización del citoesqueleto, lo cual es un evento requerido para la translocación del transportador de glucosa GLUT4 hacia la membrana plasmática, regulando así la incorporación de glucosa a las células [18].

1.3. Transportador de glucosa GLUT4

La proteína GLUT4 es uno de los 13 transportadores de azúcares (GLUT1-GLUT12 y HMIT), codificados por el genoma humano [19] que catalizan el transporte de hexosas a través de la membrana celular mediante un mecanismo de difusión facilitada ATP-dependiente [20]. El transportador GLUT4 dispone de una única característica entre los otros transportadores, en el estado basal dispone de una ubicación mayoritariamente intracelular, la cual es redistribuida hacia la membrana plasmática en respuesta a insulina u otros estímulos [21]. Específicamente, en el estado basal, el transportador GLUT4 experimenta un lento pero continuo reciclaje entre la membrana plasmática y varios compartimentos intracelulares, como sólo 5% del pool total de la proteína GLUT4 localizada en la membrana plasmática [22]. Sin embargo, en respuesta a un estímulo agudo de insulina (2 a 3 min), la tasa de la exocitosis aumenta considerablemente concomitantemente con una pequeña disminución en la exocitosis, por lo que alrededor del 50% de los transportadores GLUT4, son relocalizados a la membrana celular bajo un estímulo de insulina [23].

El transportador GLUT4 contiene secuencias únicas en sus residuos citoplasmáticos N- y COOH- terminales, que dirigen su característica capacidad de tráfico celular. Estos incluyen una secuencia característica en su N-terminal, con un residuo de fenilalanina potencialmente crítico [24], como también residuos dileucina (LL) y motivos ácidos en el COOH terminal [25]. Estos motivos gobiernan aspectos cinéticos de la endocitosis y exocitosis en este sistema de tráfico continuo.

Además, las GTPasas pequeñas como Rac1, modulan el tráfico celular del GLUT4, mediante la reorganización de la actina inducida por insulina [26].

La importancia del transportador GLUT4 en el metabolismo energético del organismo, ha sido avalada por diversos modelos fabricados por ingeniería genética. Ratones heterocigotos GLUT4 +/- que presentan una expresión disminuida en el músculo esquelético y el tejido adiposo, muestran resistencia a la insulina y además, son propensos a desarrollar diabetes, lo cual es consistente con el rol del transportador GLUT4 en la disposición efectiva de la glucosa [27].

1.4. Calcio como segundo mensajero

La modulación de la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), es un sistema de señalización involucrado en numerosos procesos, incluyendo la regulación de numerosos procesos el transporte transepitelial, aprendizaje y memoria, contracción muscular, tráfico de membrana, transmisión sináptica, secreción, motilidad, excitabilidad de membrana, expresión de genes, división celular y apoptosis. Un mecanismo ubicuo de modulación del $[Ca^{2+}]_i$ involucra la activación de la fosfolipasa C (PLC) por una variedad de estímulos que incluyen activación por ligando de proteínas G o receptores con actividad tirosina kinasa. PLC hidroliza el lípido de membrana PIP₂, generando inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) [28]. IP₃ difunde en el citoplasma y se une a su receptor (IP₃R), el cual es un canal de Ca^{2+} activado por ligando [29], que posee 3 isoformas (IP₃R1, IP₃R2 e IP₃R3). IP₃R se encuentra localizado principalmente en la membrana del retículo endoplásmico (ER) [30].

El ER es reconocido como el principal almacén de Ca^{2+} en la mayoría de las células. Las Ca^{2+} -ATPasas ubicadas en la membrana del ER, acumulan altos niveles de Ca^{2+} en el lumen. Debido a que el lumen contiene altas concentraciones de proteínas que unen Ca^{2+} , la cantidad total de Ca^{2+} puede ser mayor a 1 mM, sin embargo, la concentración de Ca^{2+} libre ha sido estimada en 100 a 700 μM [31]. En contraste, la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma, en células no estimuladas es entre 50 y 100 nM, 3 a 4 órdenes de magnitud menos que en el lumen del ER. Bajo la unión de IP_3 , el receptor de IP_3 se abre, proporcionando una vía al Ca^{2+} para difundir a través de la gradiente electroquímica, desde el lumen del ER hacia el citoplasma. El Ca^{2+} en el citoplasma se mueve mediante difusión pasiva, mientras que su movimiento es reducido por proteínas que unen Ca^{2+} , que actúan como tampones de calcio. Como consecuencia de esto, microdominios con gradientes de concentraciones de Ca^{2+} abruptas, se pueden formar y disipar rápidamente cerca de la apertura del IP_3R . Las concentraciones de Ca^{2+} adyacentes al canal abierto pueden ser cercanas a 100 μM o más, mientras las concentraciones a 1 o 2 μm del poro de canal puede ser menos de 1 μM [32].

La distribución y las concentraciones de proteínas que unen Ca^{2+} , los canales de Ca^{2+} , como también las complejas propiedades de los canales de Ca^{2+} , permiten a las señales de Ca^{2+} dependientes del IP_3R , tener diversas propiedades espaciales y temporales que pueden ser explotadas por las células. Consecuentemente, a pesar de su expresión, probablemente en todas las células, este sistema de señalización entrega señales específicas que regulan diversos procesos celulares fisiológicos.

Como otro punto a destacar, las isoformas de IP₃R presentan diferentes propiedades funcionales, lo que incrementa la posibilidad de regular funciones heterogéneas en la célula. Algunas de estas propiedades se describen a continuación:

Parámetro	IP ₃ R1	IP ₃ R2	IP ₃ R3
Po (%)	33 ± 5	27 ± 6	4 ± 1 33 ± 9
I (pA)	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,91 ± 0,04 1,8 ± 0,2
τ _o (mS)	7,0 ± 0,3	7,3 ± 0,4	ND 7,4 ± 1,2
τ _c (mS)	9,9 ± 1,3	10,6 ± 1,6	ND 9,8 ± 1,1
γ (pS)	80,0 ± 0,3	78,0 ± 0,5	74,0 ± 0,4 ND
kIP ₃ (μM)	0,27 ± 0,07	0,10 ± 0,01	0,40 ± 0,05
kATP (μM)	0,13 ± 0,04	N.A.	2 ± 0,1

Tabla 1. Propiedades funcionales de las isoformas del receptor de IP₃

Se muestra en la tabla diversas propiedades de las isoformas de IP₃R. Las propiedades de canal, Po, probabilidad de apertura; I, corriente; τ_o, período de apertura; τ_c, período de cierre; γ, conductancia; se midieron en presencia de 0,5 mM de ATP para las isoformas IP₃R1 y IP₃R2; y en presencia de 0,5 mM y 5 mM de ATP para la isoforma IP₃R3. La dependencia de IP₃, kIP₃ y la dependencia de ATP, kATP, se midieron entre 50 nM a 2 μM de IP₃ y 0 a 5 mM de ATP, respectivamente. Tu et al, Biophys J 88: 1046–1055, 2005.

2. HIPÓTESIS

El aumento de la incorporación de glucosa inducida por insulina requiere la liberación de calcio desde reservorios intracelulares dependientes del receptor de IP₃ en células musculares esqueléticas

3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el papel del calcio en la incorporación de glucosa inducida por insulina en células musculares esqueléticas.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1. Evaluar la participación del calcio extra e intracelular en la captación de glucosa inducida por insulina en células musculares esqueléticas.

4.2. Determinar la participación de los reservorios intracelulares de calcio dependientes del IP₃R y RyR en la captación de glucosa inducida por insulina.

4.3. Estudiar la participación del calcio en la activación de las vías transduccionales Akt y ERK.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron en **Sigma Chemical Co.** (St. Louis, MO, EEUU): SDS, EGTA, NaVO_4 , PMSF, glicerol, glucosa, DTT, Tween-20, reactivo de Folin Ciocalteu, tabletas de OPD, anticuerpo anti α -actina y anticuerpo anti c-myc, ácido cítrico, deoxicolato, EDTA. **De Merck** (Darmstadt, Alemania) se obtuvieron: KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 , NaOH, HCl, H_2O_2 , Na_2CO_3 , Na_2HPO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, tartrato dipotásico, NaF, pirofosfato de sodio, Tritón X-100, 2-isopropanol, formaldehído 37%. **De Amresco** (Solo, OH, EEUU): NaCl, leupeptina, aprotinina, HEPES sal sódica, Tris base, acrilamida, bisacrilamida, glicina. **De Invitrogen** se obtuvo Tripsina-EDTA 10x, Lipofectamina 2000, Rodamina-Faloidina. **De Molecular Probes** (actualmente subsidiaria de Invitrogen) se obtuvo BAPTA-AM, Alexa FLUO 488 anti-conejo y Alexa FLUO 568 anti-ratón. De Gibco (actualmente subsidiaria de Invitrogen): OPTI-MEM, MEM. **De Winkler** (Santiago, Chile) se obtuvieron: KCl, 2-mercaptoetanol, TEMED, albúmina de suero bovino (BSA), sacarosa. **De Calbiochem** (La Jolla, CA, EEUU) se adquirieron: Akt Inhibitor VIII, LY-294002, U-73122, anti-IgG conejo, anti-IgG ratón, 2-desoxi-D-glucosa 25972, citocalasina B 250233. **De PerKinElmer Life Sciences** (Boston, EEUU) se adquirieron: 2-[1,2- ^3H]-desoxi-D-glucosa NET549250UC. Los anticuerpos anti p-Akt (Ser473), p-R1, p-Erk 1/2, IR/IGF-1R y Akt se adquirieron a **Cell Signaling**. La Xestospongina B fue gentilmente donada por Jordi Molgó PhD.

Otros reactivos: Anticuerpo anti ERK (Santa Cruz), Ryanodina 630-062-M001 (Alexis Biochemicals), insulina humana Actrapid® (Novo Nordisk), Ecoscint, paraformaldehído 16% 15710-000 (Fermelo Biotec), suero fetal bovino (HyClone) y DAKO fluorescent mounting medium (DAKO inc).

5.2. Cultivo Celular

Se utilizó como modelo de trabajo la línea celular L6-GLUT-myc [33]. Corresponde a la línea de músculo esquelético de rata L6 que expresa constitutivamente un epítipo de 14 aminoácidos (AEEQKLISEEDLLK) correspondiente al c-myc humano, en el primer loop extracelular del transportador de glucosa GLUT4. Originalmente, la línea L6 se propaga como mioblastos mononucleados en presencia de medio cultivo suplementado con 10 % de SFB (medio de crecimiento). Estos mioblastos inician un proceso de diferenciación en presencia de medio de cultivo suplementado con 2% de SFB (medio de diferenciación), fusionándose espontáneamente para formar miotubos al cabo de 6 a 7 días. En el estadio de miotubos L6-GLUT4-myc, los niveles de GLUT4-myc son al menos cien veces mayores que el transportador GLUT4 endógeno, atribuyéndose la incorporación de glucosa inducida por insulina principalmente al transportador GLUT4-myc. Por otro lado, el transportador de glucosa GLUT4-myc se almacena en compartimentos específicos para el transportador GLUT4, por lo que el reciclaje vesicular que presenta el transportador GLUT4-myc es virtualmente idéntico al de GLUT4 endógeno.

5.3. Captura de glucosa

El ensayo de captura de glucosa se realizó en placas de cultivo de 12 pocillos. Primero, miotubos L6-GLUT4-myc se lavaron dos veces con PBS 1X (0,137 M NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄) y se incubaron por 3 horas en medio -MEM sin suero. A continuación se estimularon las células con insulina 100 nM por 20 min. Posteriormente, los miotubos se lavaron dos veces con tampón HEPES (140 mM NaCl, 20 mM Hepes-Na, 5 mM KCl, 2,5 mM MgSO₄, 1,0 mM CaCl₂) a temperatura ambiente. Después de este paso, se incubó por 5 min la solución de citocalasina B (10 μM 2-DG, 1,0 μCi/ml ³H-2DG y 10 μM de citocalasina B) y la solución de transporte (10 μM 2-DG y 1.0 μCi/ml ³H-2DG). Ambas soluciones se prepararon en tampón HEPES. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se agregó inmediatamente la solución de término (0,95 % p/v NaCl y 20 mM de glucosa) a 4 °C. Se lavaron dos veces las células con la solución de término, aspirándose exhaustivamente la solución después del último lavado. Después, se congelaron las células a -20 °C por 20 min. Por último, las células se lisaron con 500 μL NaOH 1N, por pocillo. Una fracción equivalente a 350 μL de lisado total fue utilizado para medir la muestra en el contador de centelleo (350 μL de muestra + 2 mL de líquido de centelleo) y el volumen restante, se destinó a la medición de la concentración de proteínas.

5.4. Detección densitométrica de GLUT4-myc en superficie

El ensayo denominado detección densitométrica de GLUT4-myc en superficie, de aquí en adelante se denominará *OPD*, nombre del reactivo que da origen al cromógeno usado en este ensayo. Esta prueba se desarrolló en placas de cultivo de 24 pocillos. Primero, miotubos L6-GLUT4-myc se lavaron dos veces con PBS 1x y se incubaron por 3 horas en medio -MEM sin suero. A continuación se estimularon las células con insulina 100 nM por 20 min. Posteriormente, se colocó la placa de cultivo sobre hielo y se lavaron las células tres veces con PBS 1x. Se fijaron las células con 500 μ L por pocillo de paraformaldehído 4% por 10 min. Rápidamente, se aspiró este reactivo y se procedió a lavar las células con glicina 100 mM, para después incubarlas por 10 min en esta solución. A continuación, se bloqueó con BSA 5% por 15 min a temperatura ambiente. Se aspiró la solución de bloqueo y se incubó con 250 μ L por pocillo de anticuerpo primario anti-myc (1:400) por 1 h y con 250 μ L de solución de bloqueo a los controles no marcados (sin anticuerpo primario), sobre hielo. Posteriormente, se retiró el anticuerpo primario anti-myc, y se lavó seis veces con PBS 1x. Nuevamente, se bloqueó con BSA 5% por 15 min a temperatura ambiente. Se aspiró la solución de bloqueo, y se incubó con 250 μ L de anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (1: 750) por 1 h, sobre hielo. Se retiró el anticuerpo secundario y se lavó seis veces con PBS 1x.

Para detectar la cantidad de anticuerpo unido al transportador GLUT4-myc en superficie, se preparó una solución de ensayo de OPD que contiene:

- Una tableta de 20 mg de OPD (O-fenilenediamina)
- 20 μL de H_2O_2 30%
- 50 mL de tampón fosfato-citrato (25,7 mL de Na_2HPO_4 0,02M, 24,3 mL de ácido cítrico 0,1M y 50 mL de H_2O) ajustado a pH 5,0.

Se aspiró el volumen de PBS 1X remanente, y se agregó rápidamente 500 μL por pocillo de solución de ensayo de OPD. Se esperó de 5 a 20 min hasta la aparición de color amarillo-anaranjado. Al momento de percibir el color, se detuvo la reacción cromogénica con 125 μL por pocillo de HCl 3N. Se transfirió 200 μL de cada pocillo a una placa de 96 pocillos, se leyó la absorbancia a 492 nm. Se determinó la cantidad de GLUT4-myc en superficie para cada condición estimulada, de la siguiente manera:

$$\text{GLUT4-myc en superficie} = \frac{\text{Abs (condición estimulada)} - \text{Abs (control no marcado)}}{\text{Abs (condición control)} - \text{Abs (control no marcado)}}$$

5.5. Obtención de extractos proteicos

Luego del tiempo de estímulo dado, se lavaron las células tres veces con PBS 1X (0,137 M NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄). Sobre hielo, se lisaron las células con 100 µL de tampón de lisis (10 mM Tris-HCl pH 7.2, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Tritón X-100, 1% deoxicolato, 5 mM EDTA) suplementado con 20 mM NaF, 1 mM pirofosfato de Na, 1 mM NaVO₄, y 1 mM PMSF, 1 µg/mL leupeptina, 1 µg/mL aprotinina. Se centrifugó el lisado obtenido a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se usó posteriormente para cuantificar proteínas y realizar el ensayo de Western blot.

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante el método de Lowry. Se ocupó una alícuota correspondiente a 5 µL al lisado obtenido en la extracción de proteínas totales y llevó a 400 µL con agua nanopura. A continuación, se agregaron 400 µL del reactivo A, compuesto de cuatro partes iguales de: CTC (CuSO₄ 0,1%, ácido tartárico 0,2%, NaCO₃ 10%), NaOH 0,8N, SDS 10% y H₂O. Se agitó y se dejó reposar la solución por 10 min, a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, se agregaron 200 µL reactivo B (Folin-Ciocalteu's y H₂O en la proporción 1:5). Se agitó la solución y se incubó a 40 °C, por 30 min. Concluido este tiempo, se midió la absorbancia de la solución a 750 nm. La curva de calibración se realizó usando concentraciones crecientes de BSA.

5.6. Western blot

El lisado celular, correspondiente a la extracción de proteínas totales, se cuantificó por el método de Lowry. Posteriormente, se cargaron entre 30 y 40 μg de proteínas, las que fueron separadas por SDS-PAGE al 10% a voltaje constante (100 V) por 2,5 h. Posteriormente, fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa o PVDF, según corresponda. La transferencia se realizó por 90 min a amperaje constante (400 mA). Las membranas se bloquearon con solución de bloqueo, correspondiente a leche descremada al 5% en TBS-tween20 0,1%, por 1 h a T° ambiente. Los anticuerpos primarios se diluyeron en solución de bloqueo (1:1000) y las membranas se incubaron con anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, las membranas fueron lavadas tres veces por 10 min en TBST e incubadas con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (1:5.000) por 1 h a temperatura ambiente. Luego las membranas se lavaron tres veces por 10 min y las bandas de proteínas se detectaron usando solución de ECL, exponiendo las membranas a un film Kodak por 1 a 10 min. Los films se escanearon y cuantificaron por densitometría.

5.7. Inmunofluorescencia Indirecta

Se detectaron proteínas de interés mediante inmunofluorescencia indirecta, en placas de cultivo de 12 pocillos con cubreobjetos de 0,18 mm de diámetro. Para ello, miotubos L6-GLUT4.-myc se lavaron dos veces con PBS 1x y posteriormente se privaron de suero por 3 h en medio -MEM. Transcurrido este tiempo, las células se estimularon con insulina 100 nM, por 20 min. A continuación, y sobre hielo, se lavaron las células tres veces PBS 1X frío y se fijaron con paraformaldehído 4% por 20 min. Se lavó dos veces con PBS 1X frío y se incubó con glicina 100 mM por 10 min. Se lavaron las células una vez con PBS 1X frío y se permeabilizó con tritón X100 0,1% por 20 min. Nuevamente, se lavó dos veces con PBS 1X frío. Se bloqueó con solución de bloqueo (BSA 3%) por 20 min. A continuación se incubó con anticuerpo primario toda la noche a 4 °C. Concurrido este tiempo, se lavaron las células con PBS 1x frío, al menos tres veces. A continuación se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a fluoróforo por 1 h. En el caso de ocupar rodamina-faloidina, se realiza en esta sección del protocolo. Posteriormente, se lavaron cinco veces las células con PBS 1x frío y se montaron los cubreobjetos con 10 µL de DAKO sobre un portaobjeto. Se dejaron los portaobjetos en total oscuridad, toda la noche. Por último, se almacenaron los portaobjetos a 4°C para ser examinados por microscopía confocal.

5.8. Transfección de DNA plasmidial

Un día antes de la transfección se mantienen las células en medio de crecimiento en ausencia de antibiótico. Además, las células deben alcanzar entre un 80% a 90% de confluencia, el día de la transfección. Primero, se diluyó el DNA a transfectar en OPTI-MEM sin suero, mezclando suavemente. Después, se mezcló la lipofectamina antes de usar, después se diluyó la cantidad apropiada en OPTI-MEM y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Acabado este tiempo, se combinó el ADN diluido con la lipofectamina diluida. Se mezcló suavemente y se incubó por 20 min a temperatura ambiente. Los complejos formados son estables por 6 h a temperatura ambiente. Se agregó el volumen total de complejos a cada pocillo de la placa de cultivo. Se incubaron las células a 37 °C por 4 h y finalmente se cambió a medio -MEM + 2% de SFB. Se probó la expresión transgénica al cabo de 48 h de la transfección.

5.9. Expresión de resultados y análisis estadísticos

Los resultados se expresaron como el valor promedio \pm desviación estándar (SEM) de a lo menos tres experimentos desarrollados en forma independiente. Se realizó análisis estadístico de múltiple varianza (ANOVA paramétrico) con un nivel de confianza aceptado inferior al 5% ($p < 0,005$). El test de Tuckey se utilizó como post-test estadístico.

6. RESULTADOS

6.1. Caracterización de la línea celular L6-GLUT-myc

Con el propósito de estudiar la funcionalidad de la línea L6-GLUT4-myc en respuesta a la acción de insulina, se evaluó la translocación hacia la membrana del transportador GLUT4, mediante la técnica de *OPD*. Miotubos L6-GLUT4-myc se estimularon con insulina 100 nM por 5, 10, 20 y 30 min. La Figura (1A) muestra, que existe un aumento significativo de los niveles del transportador GLUT4-myc en la membrana plasmática a los 5 min de estímulo con insulina y posteriormente, a los 20 min de estímulo, se detectan los mayores niveles del transportador en membrana ($1,8 \pm 0,1$ veces sobre el control). Por otro lado, se determinó mediante Western blot la activación de un nodo importante en la señalización de insulina como es la serina/treonina kinasa Akt. Para ello, miotubos L6-GLUT4-myc y L6-WT se estimularon con insulina 100 nM por 20 min y a continuación se midió la fosforilación de Akt en el residuo de serina 473, clave para la activación total de esta proteína. Conjuntamente, se incubó con Akti 10 μ M (inhibidor de Akt), 30 min antes del estímulo de insulina. Se obtuvo como resultado que tanto para la línea WT y GLUT4-myc, existe una activación de Akt/PKB, en respuesta al estímulo de insulina de 20 min, la cual es inhibida por Akti (Figura 1B). Además la activación de esta proteína no se ve afectada en mayor medida por la expresión estable del epítipo myc en el transportador GLUT4.

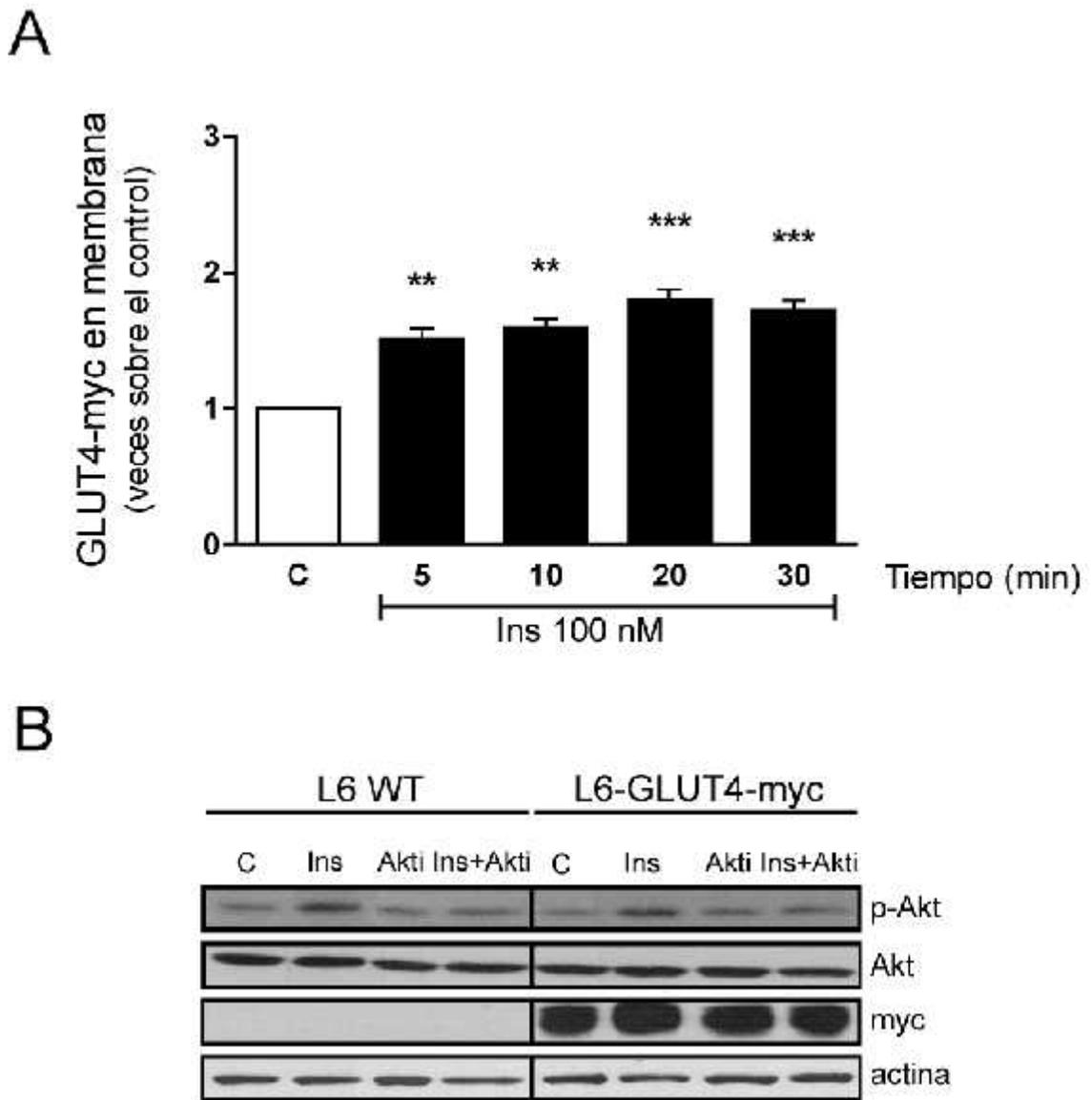


Figura 1. Efectos de insulina sobre el transportador GLUT4-myc

(A) Translocación del transportador GLUT4-myc a membrana en respuesta a insulina (Ins). El mayor efecto en la translocación del transportador GLUT4-myc se produjo a los 20 min de estímulo con insulina. **(B)** Efecto de Ins en la activación la proteína Akt. Se observa activación de la proteína Akt en miotubos L6-WT y L6-GLUT4-myc, además este efecto es independiente de la expresión estable del epítipo myc en el transportador de glucosa GLUT4. Los resultados representan el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ relativo a la condición control.

6.2. Participación del calcio extracelular e intracelular en la captación inducida por insulina

Se conoce ampliamente que una de las acciones principales de insulina es aumentar la incorporación de glucosa a las células, regulando de forma eficaz la glicemia. En esta parte del trabajo, se evaluó la participación del calcio extracelular e intracelular en el transporte de glucosa inducido por insulina. Para determinar la contribución del calcio del medio extracelular, se realizaron experimentos de captura de ^3H -2DG en presencia de EGTA, un quelante calcio no permeable a la membrana celular que posee una mayor afinidad para el ión calcio (Ca^{2+}) que para otros cationes divalentes como el ión magnesio (Mg^{2+}). Se estimularon miotubos L6-GLUT4-myc con insulina 100 nM por 20 min, en ausencia y presencia de EGTA 3mM y posteriormente se llevó a cabo el procedimiento de captura de ^3H -2DG descrito en la sección *Materiales y Métodos*. Se obtuvo como resultado una diferencia de $2,1 \pm 0,3$ veces sobre el control, para la condición estimulada con insulina en presencia de calcio extracelular y $2,2 \pm 0,3$ veces para la condición estimulada con insulina en ausencia de calcio extracelular. No existen diferencias significativas entre las condiciones estimuladas con insulina, ya sea en presencia o ausencia del quelante de calcio extracelular EGTA (Figura 2).

Por otra parte, el transporte de glucosa en las dos condiciones, se redujo drásticamente por Citocalasina B (Figura 2). Este agente químico, derivado del hongo *Helminthosporium dematoideum*, inhibe inespecíficamente la captura de glucosa [34]. Esta disminución da cuenta de la participación de los transportadores de la familia GLUT en el proceso de incorporación de glucosa, en condiciones basales y en respuesta a insulina, en las células L6-GLUT4-myc.

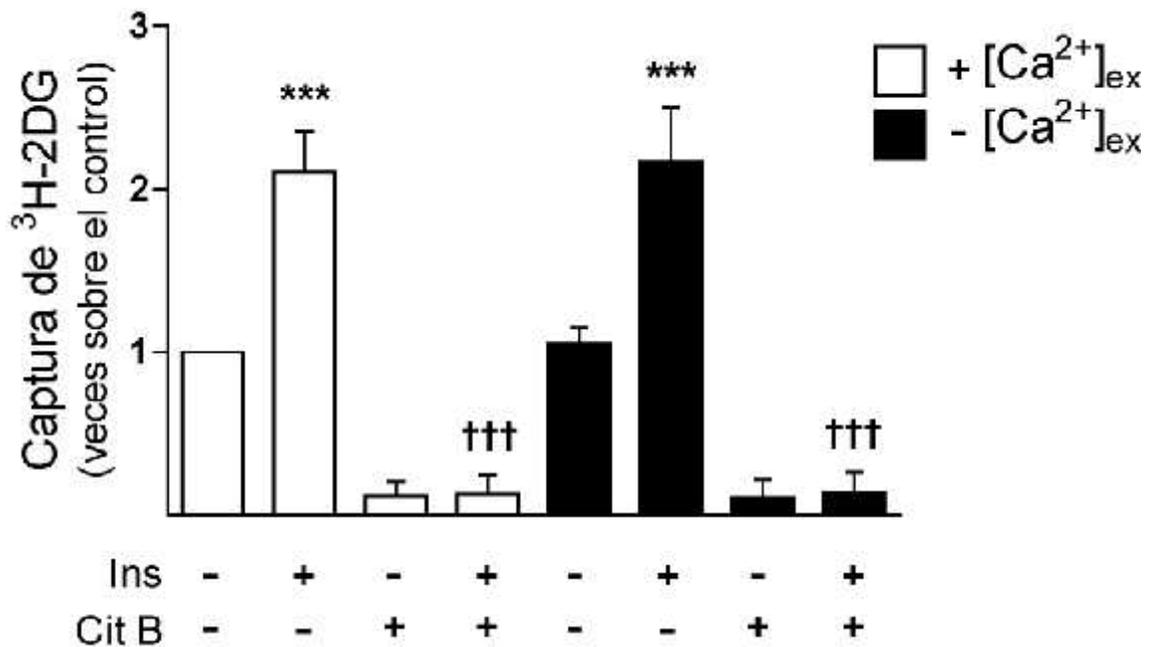


Figura 2. Participación del calcio extracelular en la incorporación de glucosa inducida por insulina

Miotubos L6-GLUT4-myc se estimularon con Ins 100 nM por 20 min y se procedió a realizar una captura de ³H-2DG. No existe una diferencia significativa entre ambas condiciones estimuladas con insulina. También se obtiene que la incorporación de glucosa es fuertemente inhibida por Citocalasina B (Cit B) en todas las condiciones experimentales. Los resultados representan el promedio ± desviación estándar de 3 experimentos independientes. ***p < 0,001 relativo a la condición control, †††p < 0,001 relativo la condición estimulada con insulina.

Al determinar que el calcio extracelular no participa en el transporte de glucosa inducido por insulina, se evaluó la contribución del calcio intracelular en este proceso. Para ello, se realizaron experimentos de captura de ^3H -2DG, en presencia y ausencia de calcio extracelular. Conjuntamente, se utilizó un quelante de calcio intracelular llamado BAPTA-AM. Se estimularon miotubos L6-GLUT4-myc con insulina 100 nM por 20 min. BAPTA-AM 50 μM se incubó por 30 min antes del estímulo de insulina y se mantuvo durante el estímulo.

En la Figura 3A se observa una diferencia de $1,8 \pm 0,2$ veces frente al control para la condición estimulada con insulina en presencia de calcio extracelular y de $1,9 \pm 0,2$ veces para la condición estimulada con insulina en ausencia de calcio extracelular. Además, se observa una caída significativa en la incorporación de glucosa en las condiciones estimuladas con insulina en presencia de BAPTA-AM 50 μM . Sin embargo se puede apreciar que la captura de glucosa basal en ambas condiciones también se ve disminuida por BAPTA-AM 50 μM . A causa de esto, se decidió probar BAPTA-AM a una concentración menor (30 μM), en idénticas condiciones experimentales. Se obtuvo como resultado, una diferencia de $2,2 \pm 0,2$ veces sobre el control para la condición estimulada con insulina en presencia de calcio extracelular y $2,2 \pm 0,1$ veces de diferencia sobre el control para la condición estimulada con insulina en ausencia de calcio extracelular. Además, se puede apreciar una disminución parcial, pero significativa, en las condiciones estimuladas con insulina en presencia de BAPTA-AM 30 μM (Figura 3B).

Se desprende de estos resultados que la acción del quelante de calcio BAPTA-AM es dependiente de la concentración, ya que a una concentración de 30 μM se obtiene una caída parcial de transporte de glucosa inducido por insulina sin afectar el transporte en condiciones basales; y a una concentración de 50 μM se obtiene una drástica caída de la incorporación de glucosa inducida por insulina, pero disminuye también la captura basal.

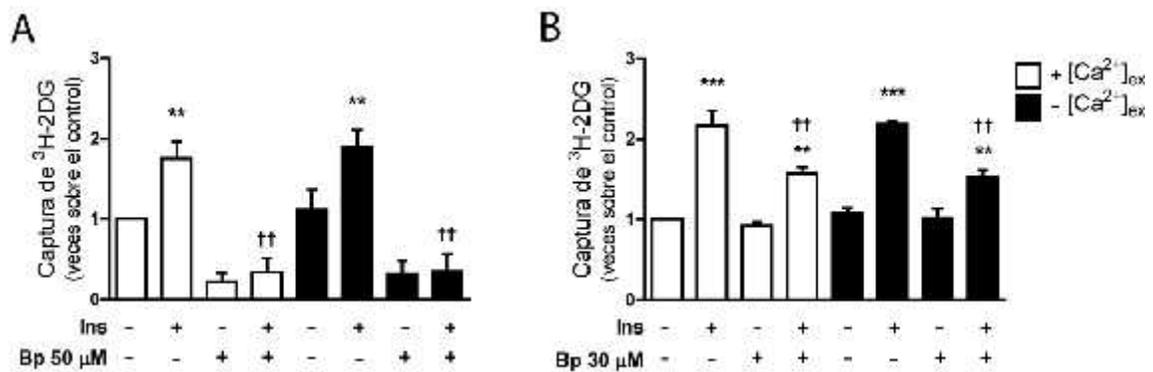


Figura 3. Participación del calcio intracelular en la incorporación de glucosa inducida por insulina

Miotubos L6-GLUT4-myc se estimularon con Ins 100 nM por 20 min en presencia del quelante de calcio intracelular BAPTA-AM (Bp). **(A)** Se observa que Bp 50 μM reduce totalmente la captación de glucosa inducida por insulina, pero afecta de manera significativa el transporte de glucosa en la condición basal. **(B)** Se puede apreciar que Bp 30 μM reduce parcialmente la incorporación de glucosa inducida por insulina, sin afectar el transporte de glucosa basal. Los resultados representan el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. ***p < 0,001, **p < 0,01 relativo a la condición control, ††p < 0,01 relativo a la condición estimulada con insulina.

6.3. Participación del calcio intracelular en la translocación del transportador inducida por insulina

Debido a que anteriormente se determinó la participación del calcio intracelular en la captura de glucosa, nace la interrogante si este calcio en particular participa en el proceso de translocación del transportador GLUT4 hacia la membrana o modifica la actividad del transportador, modulando su capacidad para incorporar glucosa. La translocación del transportador GLUT4-myc en respuesta a insulina 100 nM, se evaluó mediante la técnica de *OPD*, en condiciones experimentales en presencia y ausencia de calcio extracelular. Conjuntamente se utilizó el quelante de calcio intracelular BAPTA-AM, a una concentración de 50 μ M. Se obtuvo como resultado para la condición estimulada con insulina en presencia de calcio extracelular una diferencia de $2,2 \pm 0,4$ veces sobre el control y una diferencia de $2,2 \pm 0,3$ veces sobre el control para la condición estimulada con insulina en ausencia de calcio extracelular (Figura 4A). Por otra parte, el uso del quelante de calcio intracelular BAPTA-AM (50 μ M), reduce totalmente la translocación del transportador GLUT4-myc inducida por insulina, ya que la translocación del transportador de glucosa disminuyó a niveles cercanos al basal, en ambas condiciones experimentales (presencia y ausencia de calcio extracelular (Figura 4A)).

Asimismo, se evaluó el efecto de la expresión transgénica de la proteína tampón de calcio parvalbúmina, en la translocación del transportador GLUT4-myc. Esta proteína une calcio en condiciones normales pero no genera señal transduccional en respuesta a calcio, en contraste con la proteína calmodulina. Mioblastos L6-GLUT4-myc se transfectaron con plasmidios que expresan proteínas PV-NES-DsRed y DsRed de acuerdo al protocolo descrito en *Materiales y Métodos*. PV-NES-DsRed corresponde a la secuencia que codifica para la proteína parvalbúmina con destinación citoplasmática. Además está unida a una proteína fluorescente roja como es DsRed, lo que permite identificar aquellas células transfectadas y determinar su localización. La eficiencia de transfección fue del 60%. Además, la localización de la proteína PV-NES-DsRed y DsRed era preferencialmente citoplasmática (Figura 4B). Después de 48 h de la transfección, mioblastos L6-GLUT4-myc se estimularon con insulina 100 nM y se realizó el experimento de *OPD* para evaluar la translocación a la membrana del transportador de glucosa GLUT4-myc. Se obtuvo como resultado una caída significativa en la translocación en los mioblastos estimulados con insulina que expresaban la proteína PV-NES-DsRed con respecto a mioblastos que expresaban sólo la proteína fluorescente DsRed (Figura 4C).

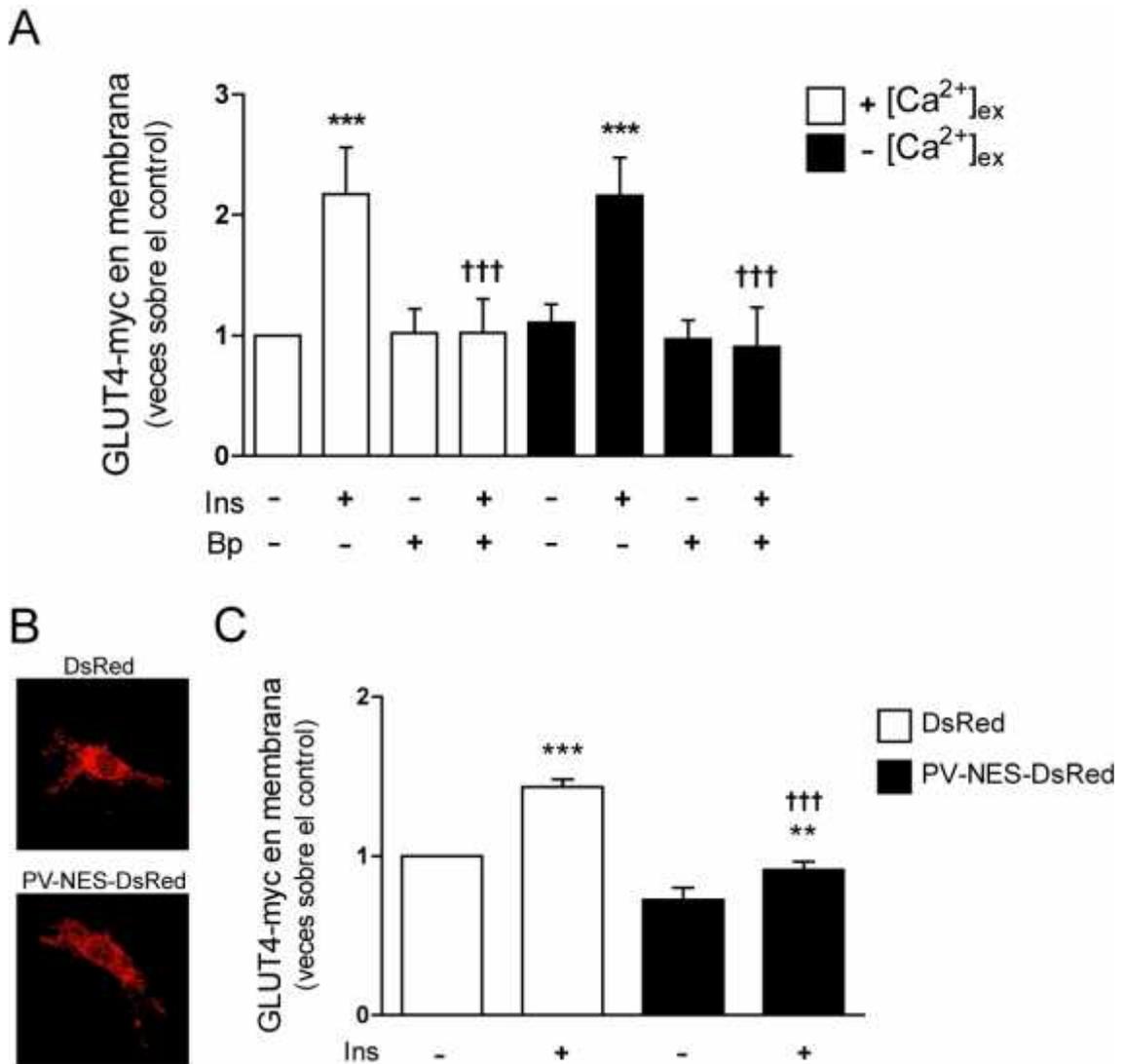


Figura 4. Participación del calcio intracelular en la translocación del transportador GLUT4-myc inducida por insulina

(A) Miotubos L6-GLUT4-myc se estimularon con Ins 100 nM por 20 min en presencia del quelante de calcio intracelular BAPTA-AM (Bp 50 μ M) y se realizó el experimento de OPD. Se observa que Bp 50 μ M reduce totalmente la translocación del transportador GLUT4-myc, inducida por insulina. (B) Mioblastos L6-GLUT4-myc transfectados con los plasmidios DsRed y PV-NES-DsRed. Se observa que la distribución de las proteínas transfectadas es preferencialmente citoplasmática. (C) Mioblastos L6-GLUT4-myc transfectados con las proteínas DsRed y PV-NES-DsRed se estimularon con Ins 100 nM y se procedió a realizar el experimento de OPD. Se observa una caída en la translocación del transportador GLUT4-myc en los mioblastos que expresan la proteína PV-NES-DsRed. Los resultados representan el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. ***p < 0,001, **p < 0,01 relativo a la condición control, †††p < 0,001 relativo a la condición estimulada con insulina.

Por último, se evaluó descriptivamente mediante inmunofluorescencia indirecta, la translocación del transportador GLUT4-myc en respuesta a insulina en células únicas. La Figura 5A muestra un claro aumento en la fluorescencia asociado a la mayor cantidad del transportador en membrana, por acción de insulina. El quelante de calcio intracelular BAPTA-AM a una concentración de 50 μ M, reduce la fluorescencia a los niveles basales. Además, insulina promueve la reorganización de la actina a nivel de la membrana, efecto descrito en la literatura como necesario para la translocación del transportador GLUT4 a la superficie celular. Interesantemente, esta reorganización de la actina inducida por insulina, también es inhibida por BAPTA-AM 50 μ M, lo que da cuenta de la participación del calcio intracelular en este proceso. La figura 5B, muestra una cuantificación del perfil de las variaciones de fluorescencia, asociadas a los cambios en el citoesqueleto de actina. A partir del borde de la célula, se trazó una línea de 150 píxeles, que recorre las fibras de actina perpendicularmente. Posteriormente, se analizaron las variaciones de la fluorescencia que describe la línea trazada. En el estado basal, se describe un patrón característico de la organización de las fibras de actina, que se compone de sucesivos aumentos y disminuciones de la fluorescencia, a medida que se recorre la célula desde la membrana. En contraste, Insulina promueve la reorganización de la actina a nivel de la membrana, ya que su perfil de variación es significativamente distinto al descrito en el estado basal. Se describe como un aumento de la fluorescencia sin oscilaciones muy definidas. Insulina, en presencia de BAPTA-AM, presenta un patrón similar al expuesto en el estado basal.

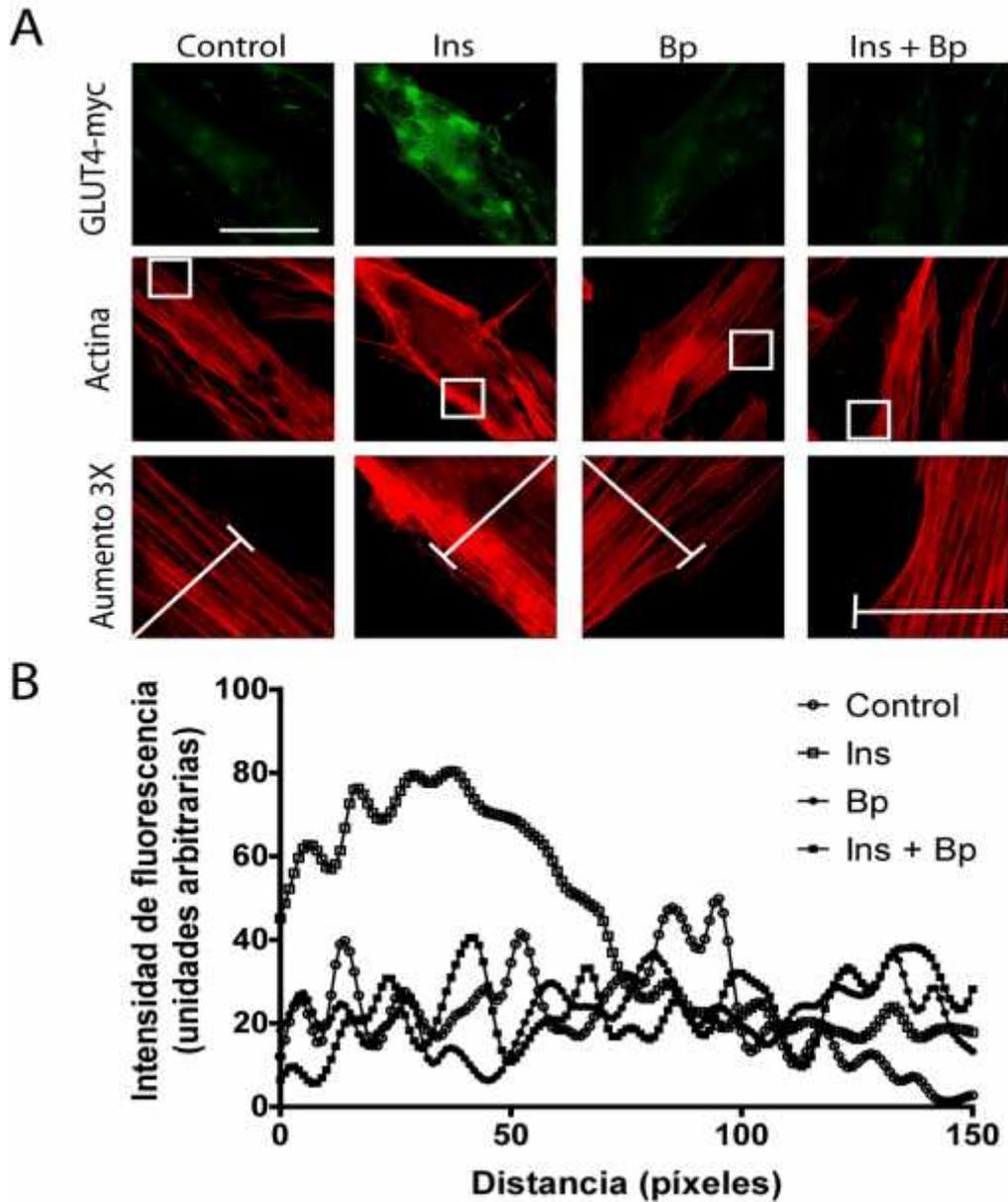


Figura 5. Participación del calcio intracelular en la translocación del transportador GLUT4-myc y remodelamiento de actina inducido por insulina

(A) Miotubos L6-GLUT4-myc se estimularon con Ins 100 nM por 20 min en presencia de BAPTA-AM (Bp 50 μ M). Insulina aumenta la fluorescencia significativamente con respecto al basal, dado que incrementa en número de transportadores GLUT4 en superficie (verde), efecto que es disminuido por Bp 50 μ M. Además, se puede apreciar que Ins 100 nM promueve la reorganización de la actina (rojo), evento necesario para la translocación del GLUT4. El quelante BAPTA-AM también atenúa este proceso. El recuadro blanco representa la zona que fue aumentada. La línea blanca trazada en la última fila de imágenes simboliza cómo se analizó la célula para obtener un perfil. (B) Perfil de variaciones de la fluorescencia asociado a los cambios de la actina cortical. La barra blanca representa 50 μ M.

6.4. Participación del calcio extracelular e intracelular en la activación de Akt dependiente de insulina

Se estableció en los puntos anteriores que el calcio intracelular participa en la translocación del transportador de glucosa GLUT4 y, por consiguiente, en el transporte de glucosa en respuesta a insulina. Por tanto, queda la interrogante si el calcio intracelular participa en la activación de Akt, nodo importante en la señalización de insulina y descrito en participar en la señal necesaria para llevar a cabo el transporte de glucosa. Para ello, se estimularon miotubos L6-GLUT4-myc con insulina 100 nM por 20 min. Se determinó la fosforilación de las proteínas involucradas en la cascada de señalización de insulina, IR, Akt y ERK 1/2, en condiciones de presencia y ausencia de calcio extracelular. Además se utilizó el quelante de calcio, BAPTA-AM a una concentración de 50 μ M, con el fin de determinar la participación del calcio intracelular en la activación de IR, Akt y ERK 1/2. Se obtuvo como resultado que no existen diferencias en la fosforilación del IR en presencia y ausencia de calcio extracelular. Además, el uso del quelante de calcio intracelular BAPTA-AM no disminuye la fosforilación de IR (Figura 6B). Con respecto a la proteína kinasa Akt, la presencia del quelante de calcio intracelular BAPTA-AM 50 μ M, disminuye drásticamente su fosforilación en el residuo serina 473, clave para la activación de esta kinasa en respuesta a insulina (Figura 6B).

Por otro lado, la ausencia de calcio intracelular no afecta significativamente a las kinasas ERK 1/2, otras proteínas relacionadas con la cascada de insulina pero que ejercen un control sobre el crecimiento y diferenciación celular (Figura 6B). Específicamente, la proteína ERK1 (p44 MAPK) aparentemente se activa bajo la acción del calcio extracelular, ya que existe una tendencia a la disminución en la fosforilación de la proteína en presencia del quelante de calcio extracelular, EGTA. En cambio, la fosforilación de la proteína ERK2 (p42 MAPK) no se afectó significativamente por la ausencia del calcio extracelular o intracelular.

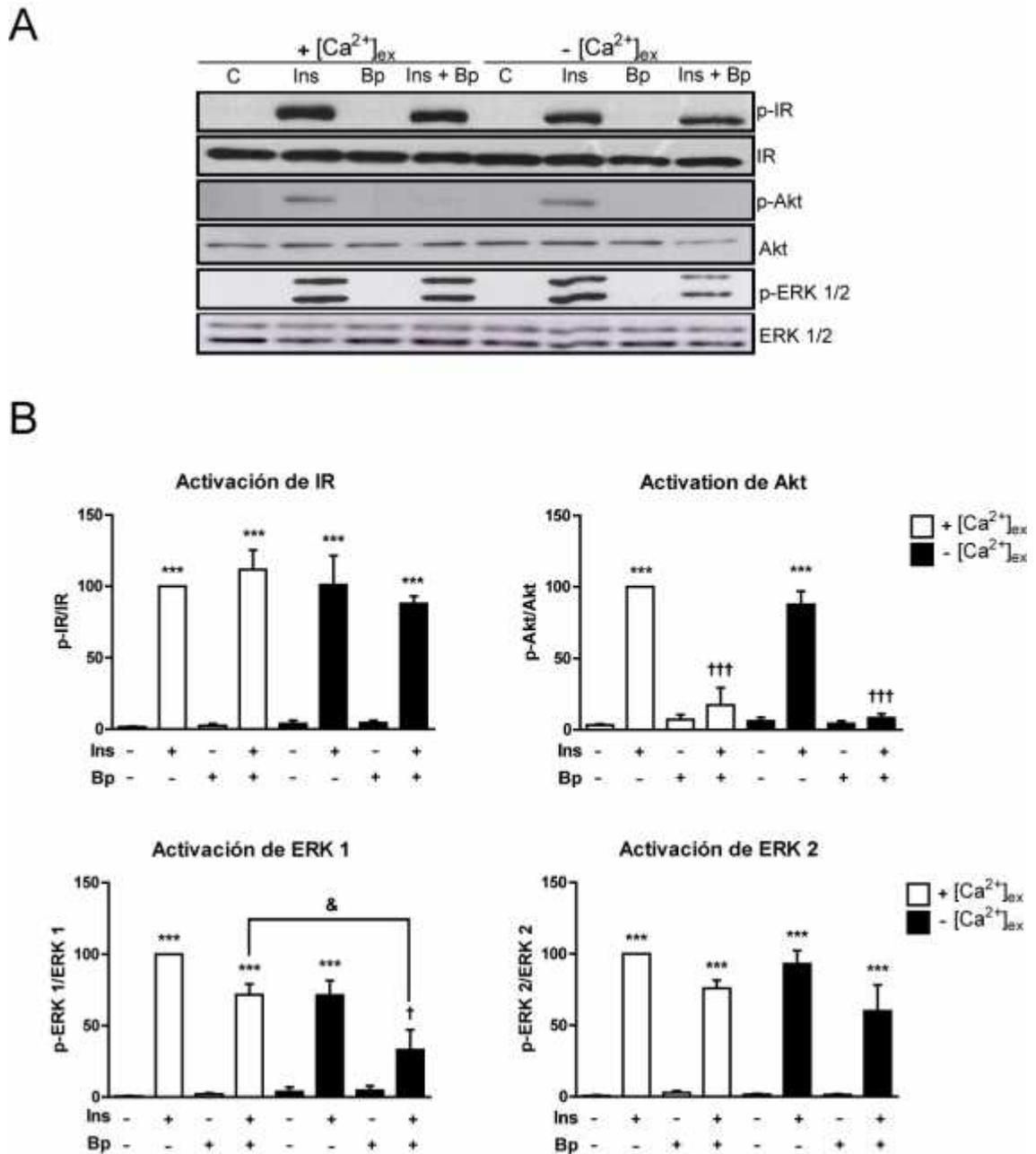


Figura 6. Participación del calcio extracelular e intracelular en la activación de IR, Akt y ERK 1/2 dependiente de insulina

Miotubos L6-GLUT4-myc se estimularon con Ins 100 nM por 20 min en presencia del quelante de calcio intracelular BAPTA-AM (Bp 50 μ M). Posteriormente, se midió la fosforilación de IR, Akt y ERK 1/2. Se obtiene que el uso de Bp 50 μ M no altera los niveles de fosforilación de IR y afecta diferencialmente a las quinasas ERK 1/2. Especialmente, la ausencia de calcio intracelular afecta drásticamente la fosforilación de Akt en ser473, en respuesta a insulina. Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. *** p < 0,001, relativo a la condición control, ††† p < 0,001, † p < 0,05, relativo a la condición estimulada con insulina, & p < 0,05, relativo a la condición en presencia de calcio extracelular.

6.5. Detección subcelular de IP₃R y RyR en células musculares esqueléticas L6-GLUT4-myc

En los experimentos anteriores, se demostró que el calcio intracelular participa en una serie de procesos involucrados en la acción de insulina. Por lo tanto, es importante determinar que reservorio específico de calcio es el encargado de gobernar estas acciones. Con el objetivo de responder esta interrogante, se realizó una inmunofluorescencia en miotubos L6-GLUT4-myc permeabilizados para detectar IP₃R y RyR, principales controladores de la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico, principal almacén de calcio en la célula. Este experimento se realizó con el fin de demostrar si estas proteínas estaban presentes en la línea L6-GLUT4-myc, específicamente en el estadio celular de miotubo maduro. Se muestran en la figura 7, las diferentes distribuciones de las isoformas de IP₃R. Específicamente, la distribución de la isoforma IP₃R1 es preferentemente nuclear, debido a la alta superposición que existe con la zona marcada con el colorante fluorescente Hoechst, el cual se une con gran afinidad al DNA. IP₃R1 también se distribuye en el citoplasma pero en menor proporción con respecto al núcleo. En contraste, IP₃R2 posee una alta localización citoplasmática. La isoforma IP₃R3 posee una disposición predominantemente nuclear, aunque su patrón de distribución es diferente al de IP₃R1. Por otro lado, respecto a las isoformas del RyR, sólo se detectó RyR1, la cual se localiza ampliamente en el citoplasma. Cabe resaltar, que estas proteínas aparecen durante el proceso de diferenciación, ya que no se encontraron isoformas de IP₃R ni de RyR en mioblastos L6-GLUT4-myc.

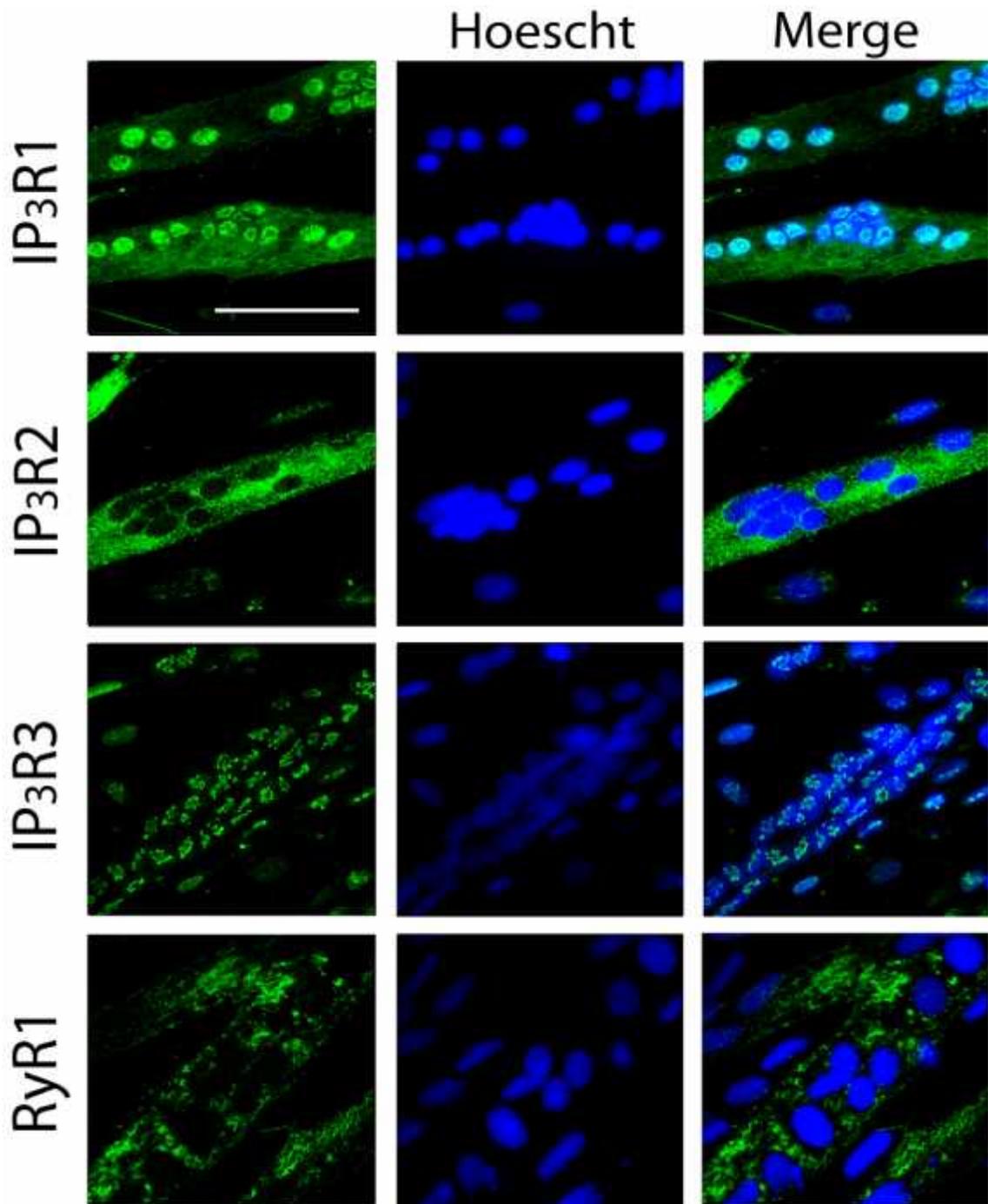


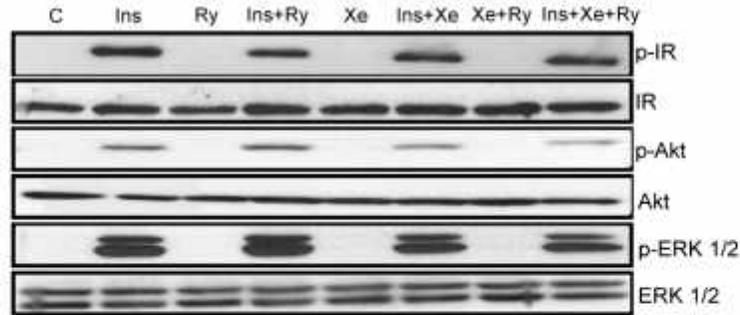
Figura 7. Presencia de IP₃R y RyR en miotubos L6-GLUT4-myc

La presencia IP₃R y RyR (verde) en miotubos L6-GLUT4-myc se detectó mediante inmunofluorescencia indirecta. La isoforma de IP₃R1 se distribuye principalmente en el núcleo (azul). En el citoplasma se ubica preferentemente la isoforma IP₃R2. La ubicación de IP₃R3 también es nuclear, pero su patrón distribución es diferente a IP₃R1. Con respecto a RyR, la isoforma encontrada es RyR1, cuya distribución es sustancialmente citoplasmática. La barra blanca representa 50 μ M.

6.6. Participación de IP₃R y RyR en fosforilación de Akt inducida por insulina

Se determinó anteriormente la existencia de IP₃R y RyR en miotubos L6-GLUT4-myc, principales receptores/canales de Ca²⁺ involucrados en la liberación de este segundo mensajero desde reservorios específicos en el retículo sarcoplásmico. Por lo tanto, resta por comprobar si la liberación de calcio a través de estas proteínas está involucrada en la acción de insulina, específicamente en la fosforilación de Akt. Para ello, miotubos L6-GLUT4-myc, se estimularon con insulina 100 nM, en presencia de un bloqueador específico de IP₃R, como es xestospongina B y Ryanodina, a concentraciones inhibitorias, las cuales bloquean el RyR. Tanto, xestonpongina B 20 μM como Ryanodina 50 μM, se preincubaron por 1 h antes del estímulo de insulina, y se mantuvieron en el medio mientras el estímulo se llevaba a cabo. Posteriormente, la fosforilación de las proteínas IR, Akt y ERK1/2 se determinó mediante *Western blot*. La Figura 8 confirmó que la fosforilación de IR dependiente insulina no es afectada por una disminución del calcio intracelular. Específicamente, el uso de Ryanodina y xestospongina B no afectan significativamente la activación de IR. En contraste, la fosforilación de Akt inducida por insulina, disminuyó significativamente por xestospongina B 20 μM. ryanodina 50 μM, no tuvo efecto sobre la fosforilación en el residuo ser473 de Akt. Por otro lado, el uso de estos antagonistas específicos, no afectó significativamente la fosforilación de las proteínas ERK 1/2.

A



B

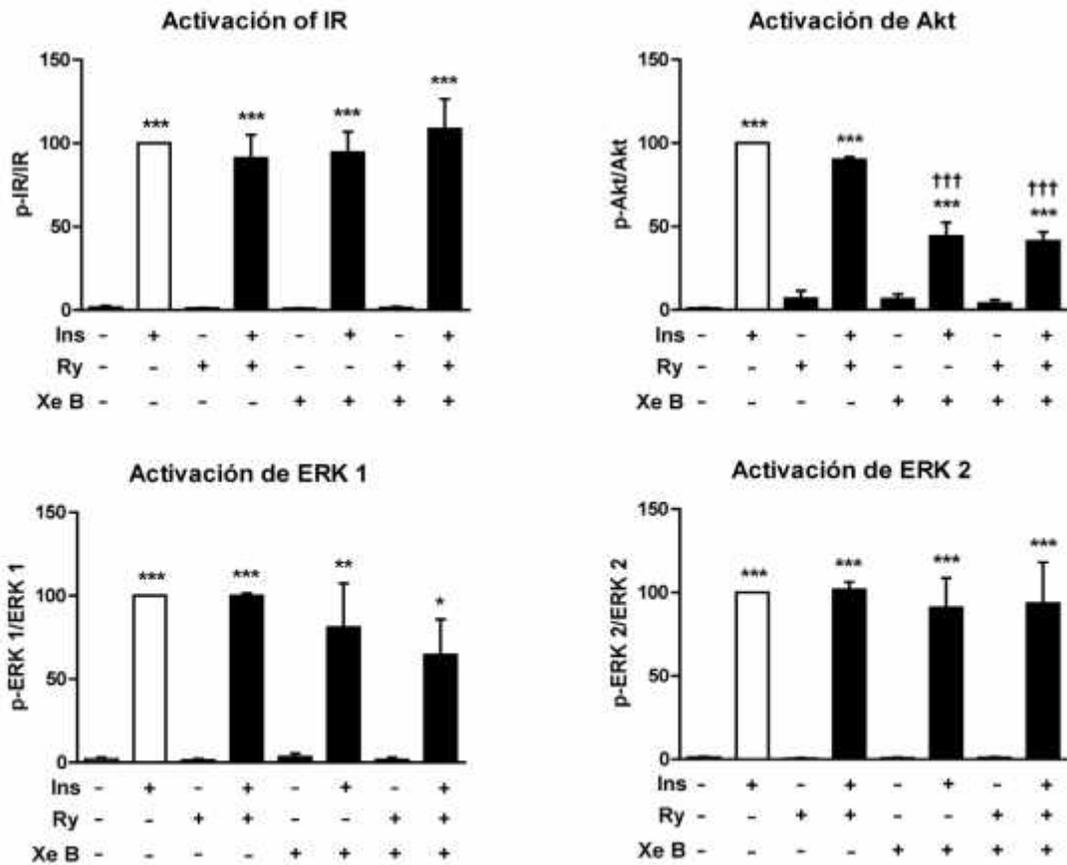


Figura 8. Participación de IP₃R y RyR en la activación de IR, Akt y ERK 1/2 inducida por insulina

Miotubos L6-GLUT4-myc se estimularon con Ins 100 nM por 20 min en presencia de Xestospongina B (Xe B) 20 μ M y Ryanodina (Ry) 50 μ M. Posteriormente, se midió la fosforilación de IR, Akt y ERK 1/2. Xe B disminuye significativamente la fosforilación de Akt en el residuo ser473. Ry 50 μ M no tiene ningún efecto significativo sobre la activación de IR, Akt y ERK 1/2. Los resultados representan el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. ***p < 0,001, **p < 0,01, *p < 0,05, relativo a la condición control, †††p < 0,001, relativo a la condición estimulada con insulina.

6.7. Participación de reservorios específicos de calcio en la translocación del transportador GLUT4 inducida por insulina

Anteriormente, se demostró que el calcio intracelular participa activamente en la translocación del transportador de glucosa GLUT4 hacia membrana celular. Sin embargo, queda por describir si los reservorios de calcio, dependientes tanto de IP₃R como de RyR, participan en este proceso. Además, se debe comprobar si la disminución parcial, pero significativa, inducida por xestospongina B, sobre la fosforilación de Akt, afecta la translocación del GLUT4. Para determinar esta posibilidad, se examinó la translocación del transportador GLUT4-myc, mediante la técnica de *OPD*. Miotubos L6-GLUT4-myc se estimularon con insulina 100 nM, en presencia de xestonpongina B 20 μM y ryanodina 50 μM. Estos bloqueadores específicos de IP₃R y RyR, se incubaron 1 h antes del estímulo y permanecieron en el medio -MEM durante el estímulo. Se consiguió como resultado para la condición estimulada con insulina una diferencia de $2,2 \pm 0,2$ veces sobre el control. Para la condición estimulada con insulina en presencia de Ryanodina, se obtuvo una disminución leve sobre la translocación, con una diferencia de $1,7 \pm 0,3$ veces sobre el control (Figura 9A). El uso del bloqueador específico de IP₃R, xestospongina B, también disminuye la translocación del transportador GLUT4-myc, con una diferencia de $1,6 \pm 0,1$ veces sobre el control. La acción conjunta de ryanodina y xestospongina B no provocó mayor diferencia sobre la condición solamente estimulada con xestospongina B ($1,6 \pm 0,2$ veces sobre el control).

Por otra parte, se estudió el uso de inhibidor de la proteína PLC, U-73122 y el inhibidor de la proteína PI3K, LY-294002. Miotubos L6-GLUT4-myc, se estimularon con insulina 100 nM y se realizó el experimento de *OPD*. Los inhibidores, U-73122 10 μ M y LY-294002 50 μ M se incubaron por 30 min antes del estímulo de insulina y se mantuvieron en el medio mientras el estímulo se llevo a cabo. La Figura 9B muestra una disminución significativa en la translocación del transportador GLUT4-myc inducida por insulina, cuando se usó U-73122. Se obtuvo una diferencia de $2,2 \pm 0,2$ veces sobre el control, para la condición estimulada con insulina, en contraste con la condición que se incubó con U-73122, en la cual se obtuvo una diferencia de $1,8 \pm 0,1$ veces sobre el control. Además, el inhibidor de PI3K disminuyó totalmente la translocación a los niveles basales, se obtuvo una diferencia de $1,2 \pm 0,2$ veces sobre el control.

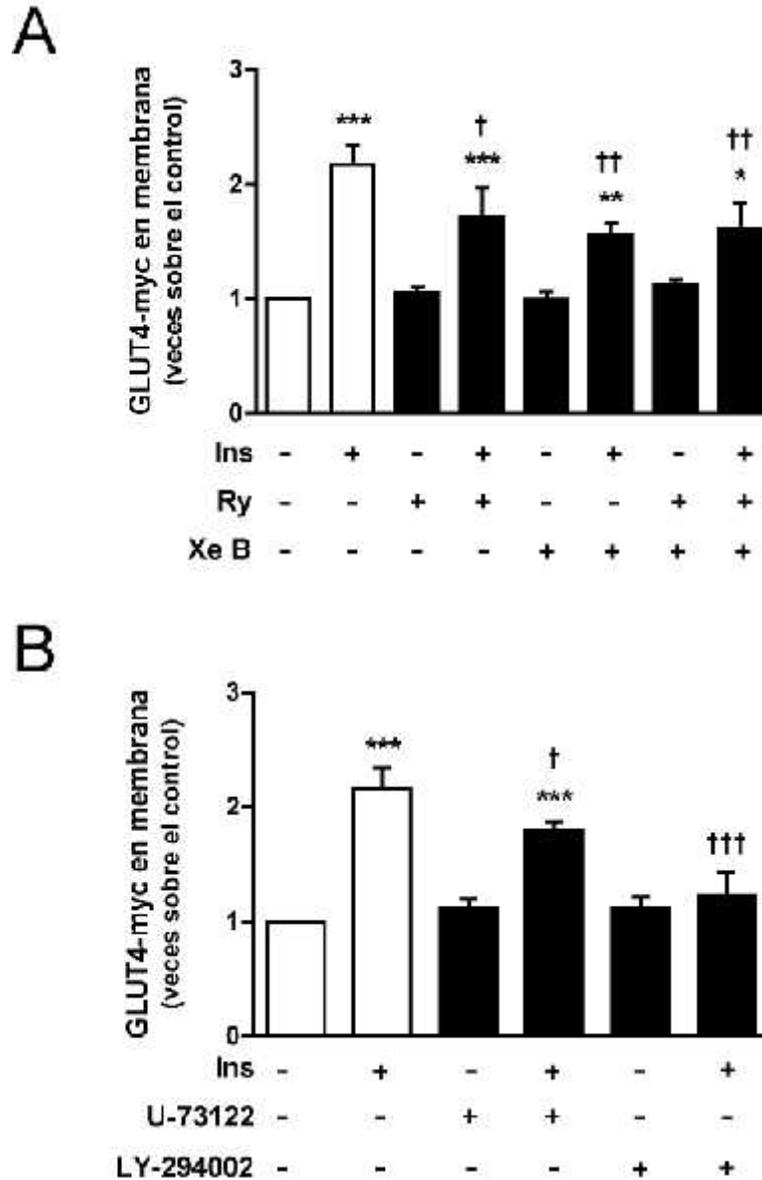


Figura 9. Participación de reservorios específicos de calcio en la translocación del transportador GLUT4-myc inducida por insulina

(A) Miotubos L6-GLUT4-myc se estimularon con Ins 100 nM por 20 min en presencia de Xestospongina B (Xe B 20 μ M) y de Ryanodina (Ry 50 μ M), y se procedió a realizar el experimento de OPD. Se observa que Xe B reduce significativamente la translocación del transportador GLUT4-myc, inducida por insulina. Además, Ry disminuye levemente la translocación del transportador GLUT4-myc. (B) Miotubos L6-GLUT4-myc se estimularon con Ins 100 nM por 20 min en presencia de U-73122 10 μ M y LY-294002 50 μ M. U-73122, inhibidor de PLC, disminuye significativamente la translocación hacia la membrana del transportador GLUT4-myc. Los resultados representan el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. ***p < 0,001, **p < 0,01, *p < 0,05, relativo a la condición control, †††p < 0,001, ††p < 0,01, †p < 0,05 relativo a la condición estimulada con insulina.

También se estudió el efecto del bloqueo del receptor de IP_3 , en la translocación del transportador GLUT4-myc en células únicas, mediante inmunofluorescencia indirecta. Para ello, las células L6-GLUT4-myc se estimularon con insulina 100 nM en presencia de xestospongina B 20 μ M. El bloqueo específico de IP_3R , disminuyó la translocación del GLUT4-myc, inducida por insulina (Figura 10A). Además, se pudo apreciar que la reorganización de la actina inducida por insulina, es atenuada por el tratamiento de las células con xestospongina B. La Figura 10B muestra la cuantificación del perfil de las variaciones de fluorescencia, asociadas a la reorganización en el citoesqueleto de actina. Insulina, en presencia de xestospongina B presentó un patrón de oscilaciones similar al mostrado en el estado basal, sin embargo los aumentos de la fluorescencia tienden a ser mayores.

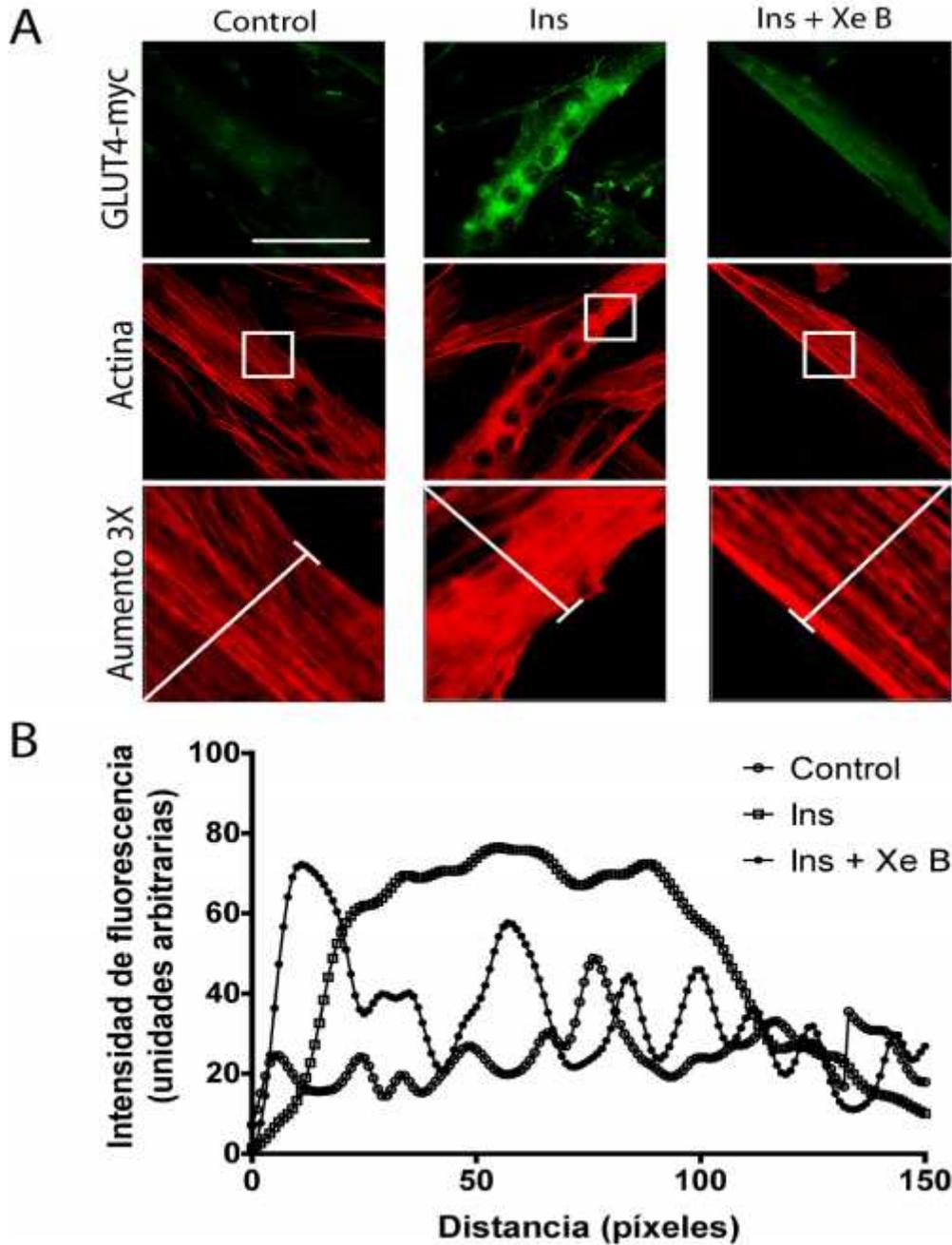


Figura 10. Participación de IP₃R en la translocación del transportador GLUT4-myc y remodelamiento de actina dependiente de insulina

(A) Miotubos L6-GLUT4-myc se estimularon con Ins100 nM por 20 min en presencia de Xestospongina B (Xe B 20 μ M). Se observa que el uso de Xe B reduce sustancialmente el aumento de transportadores en superficie inducido por insulina. Además, la reorganización de la actina es atenuada por el bloqueo de IP₃R. El recuadro blanco representa la zona que fue aumentada. La línea blanca trazada en la última fila de imágenes simboliza cómo se analizó la célula para obtener un perfil. (B) Perfil de variaciones de la fluorescencia asociado a los cambios de la actina cortical. La barra blanca representa 50 μ M.

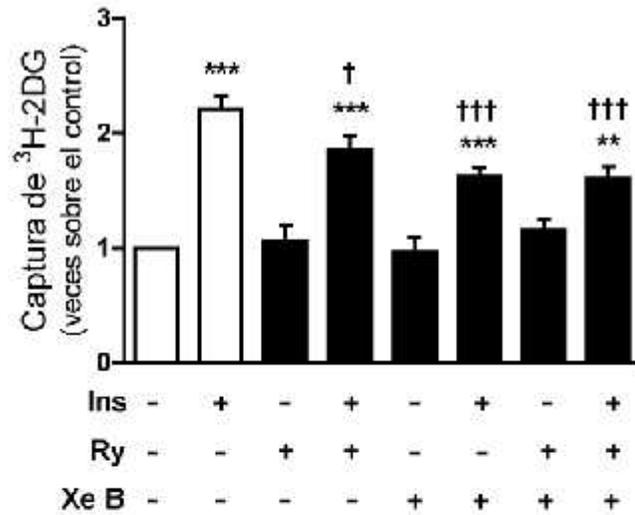
6.8. Participación de reservorios específicos de calcio dependiente de IP₃R y RyR en la captación de glucosa inducida por insulina

Por último, se determinó la participación de IP₃R y RyR en la incorporación de glucosa inducida por insulina, una prueba funcional de que la liberación de calcio a través de estos receptores/canales participa en este proceso importante para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. Además, se puede establecer con claridad una relación que involucra el bloqueo de IP₃R, el cual disminuiría significativamente la fosforilación de Akt, afectando consecuentemente la translocación del transportador GLUT4 hacia la membrana. Queda, por demostrar entonces, si una caída en el transporte de glucosa es la consecuencia final del bloqueo específico de IP₃R. Para demostrar lo anterior, miotubos L6-GLUT4-myc se estimularon con insulina 100 nM. xestospongina B 20 μ M y ryanodina 50 μ M se incubaron 1 h antes del estímulo de insulina y permanecieron en el medio hasta que el estímulo se llevó a cabo. La Figura 11A muestra un aumento en la captura de glucosa de $2,2 \pm 0,1$ veces sobre el control, para la condición estimulada con insulina. Además se puede apreciar que ryanodina 50 μ M disminuyó parcialmente la incorporación de glucosa mediada por insulina. Específicamente se obtuvo una diferencia de $1,9 \pm 0,1$ veces sobre el control. El bloqueo de IP₃R, ejercido por xestospongina B disminuyó significativamente la captura de glucosa, dando una diferencia de $1,6 \pm 0,1$ veces sobre el control. El uso de ryanodina con xestospongina B no provocó mayor diferencia que incubación solamente con xestospongina B (Figura 11A).

Teniendo en cuenta los últimos resultados, se evaluó el efecto de inhibir la producción de IP₃, mediante la inhibición de PLC, en la incorporación de glucosa inducida por insulina. Para ello, miotubos L6-GLUT4-myc, se trataron con insulina 100 nM y se realizó el experimento de *Captura de glucosa*. Los inhibidores, U-73122 10 μM y LY-294002 50 μM se incubaron 30 min antes del estímulo de insulina y se mantuvieron en el medio -MEM, mientras el estímulo se llevo a cabo. Se obtuvo como resultado, que insulina promueve un aumento de $2,2 \pm 0,1$ veces sobre el control, en la captura de glucosa.

El inhibidor de PLC U-73122 disminuyó significativamente la incorporación de glucosa inducida por insulina. Se obtuvo una diferencia de 1,7 veces sobre el control para este compuesto. Además, el inhibidor de PI3K, LY-294002 disminuyó totalmente la captación de glucosa inducida por insulina, con una diferencia de $1,0 \pm 0,2$ veces sobre el control.

A



B

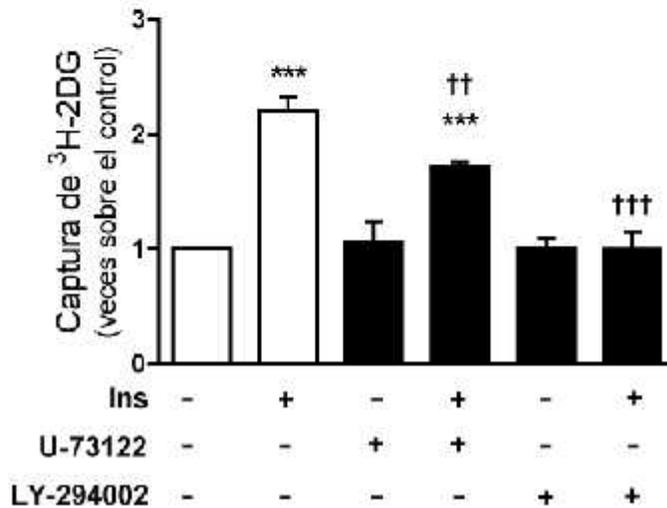


Figura 11. Participación de IP₃R y RyR en la incorporación de glucosa inducida por insulina

(A) Miotubos L6-GLUT4-myc se estimularon con Ins 100 nM por 20 min en presencia de Xestospongina B (Xe B 20 μM) y de Ryanodina (Ry 50 μM). Se observa que Xe B reduce significativamente la captación de glucosa inducida por insulina. Además, Ry disminuye levemente este parámetro. (B) Miotubos L6-GLUT4-myc se trataron con Ins100 nM por 20 min en presencia de U-73122 10 μM y LY-294002 50 μM. U-73122, inhibidor de PLC, disminuye significativamente la captación de glucosa inducida por insulina. Los resultados representan el promedio ± SEM de 3 experimentos independientes. ***p < 0,001, **p < 0,01, relativo a la condición control, †††p < 0,001, ††p < 0,01, †p < 0,05 relativo a la condición estimulada con insulina.

7. DISCUSIÓN

7.1. Participación del calcio en el transporte de glucosa dependiente de insulina

El presente trabajo se centró en definir la participación del Ca^{2+} , en el transporte de glucosa inducido por insulina en células musculares esqueléticas. Específicamente, se trató de relacionar con una ruta de señalización vinculada a la liberación de calcio desde los reservorios dependientes del receptor de IP_3 . Finalmente se comprobó, que la liberación de Ca^{2+} dependiente de IP_3 participa en la activación de Akt, importante regulador de la translocación del transportador GLUT4, por consiguiente, del transporte de glucosa.

En el músculo esquelético se ha tratado de establecer un vínculo entre insulina y calcio. Los primeros trabajos, en el año 1976, describían un nexo en la acción de insulina y cambios en las concentraciones de Ca^{2+} [35]. Posteriormente, otro grupo de investigación determinó que insulina aumenta los niveles de Ca^{2+} específicamente, cerca de la membrana celular, mediante el uso de la sonda fluorescente sensible a calcio, FIP18, que tiene la particularidad de ser altamente lipofílica [36]. Más adelante, se trató de vincular el aumento de calcio intracelular con la incorporación de glucosa mediada por insulina en fibras FDB. Se demostró que un influjo de calcio participa en la incorporación de 2-NBDG (un análogo fluorescente de glucosa). Además, se determinó que 2-APB (un bloqueador inespecífico del IP_3R que también actúa sobre las canales de calcio tipo L) disminuye la captación de este análogo de glucosa en respuesta a insulina.

Sin embargo, 2-APB no disminuye la fosforilación de Akt y ERK 1/2 en respuesta a insulina. Por lo tanto, este trabajo confiere importancia al Ca^{2+} en las últimas etapas de la señalización de insulina, como la translocación del transportador GLUT4 [37]. Diversos estudios sobre la asociación entre insulina y Ca^{2+} , se han realizado en otros tipos celulares. En adipocitos 3T3-L1, se demostró que BAPTA-AM, disminuye considerablemente de una manera concentración-dependiente, la incorporación de análogos de glucosa, 2-DG (2-desoxiglucosa) y 3-O-MG (3-O-metil-D-glucosa). Además, BAPTA-AM también disminuye la translocación del GLUT4 [38]. Nuestros resultados confirman en gran parte estas premisas obtenidas en otros modelos. Primero, la incorporación de glucosa inducida por insulina es independiente de la participación del calcio extracelular, debido a que EGTA (quelante de calcio extracelular), no modifica la incorporación de glucosa a las células. En contraste, se demostró que la ausencia de calcio intracelular, mediante la incubación de BAPTA-AM, disminuyó el transporte de glucosa inducido por insulina.

7.2. Participación del calcio en translocación del transportador de glucosa GLUT4 dependiente de insulina

En este trabajo también se analizó la participación del calcio en la translocación del GLUT4, disponiendo de una herramienta eficaz y confiable como es la técnica de *OPD*. Nuestros resultados confirman que el calcio extracelular no participa en la incorporación de glucosa mediada por insulina, ya que la translocación del transportador GLUT4, proceso clave para la entrada de glucosa a la célula, tampoco se afectó por ausencia del calcio extracelular. Además, el uso de BAPTA-AM y la expresión de la proteína tampón de calcio PV-NES-DsRed, confirman que el calcio intracelular participa en la translocación del transportador GLUT4, y por lo tanto, en el transporte de glucosa inducido por insulina.

Específicamente, el Ca^{2+} ha sido directamente relacionado como participante en la translocación del GLUT4. La proteína sensora de calcio sinaptotagmina VII (Syt VII) se ha propuesto como reguladora del tráfico del GLUT4. En adipocitos aislados de ratones Syt VII *-/-*, existe una disminución significativa del transporte de glucosa inducido por insulina, con respecto a los adipocitos WT. Sin embargo, estos adipocitos Syt VII *-/-* presentan en el estado basal altas cantidades de GLUT4 en superficie, donde insulina falla en modular el tráfico del transportador GLUT4 [39]. La participación del calcio en la translocación del GLUT4, y por lo tanto, en el transporte de glucosa, también se ha vinculado con la proteína CaMKII.

Se ha postulado que insulina regula la proteína motora Myo1c mediante la fosforilación dependiente de CaMKII, modulando el tráfico del GLUT4 inducido por insulina, involucrando la actividad motora de Myo1c [40]. Esta proteína Myo1c también ha sido relacionada con el control de la reorganización del citoesqueleto.

El remodelamiento de la actina se ha asociado a la translocación del GLUT4 [41]. Las dinámicas de actina reguladas por proteínas como Arp2/3 y Cofilin, coordinan la translocación del transportador GLUT4 a la superficie de la célula [42]. Específicamente, Cofilin (una proteína esencial en la regulación de la dinámica de actina) es inactivado por fosforilación y reactivado por desfosforilación. Se sabe que Cofilin experimenta desfosforilación en respuesta a estímulos extracelulares que aumenten el $[Ca^{2+}]_i$.

Nuestros resultados relacionan la participación del calcio intracelular en el remodelamiento de actina. Interesantemente, la reorganización de la actina cortical inducida por insulina, es inhibida por el uso del quelante de calcio BAPTA-AM (50 μ M), lo que da cuenta de la participación del calcio intracelular en este proceso. Diversos trabajos exponen que Cofilin experimenta defosforilación mediante un mecanismo que depende de Slingshot (una proteína fosfatasa) dependiente de calcineurina, una fosfatasa que depende de Ca^{2+} para su acción [43], lo que podría establecer el nexo entre el Ca^{2+} y el remodelamiento de actina inducido por insulina.

Por otro lado, la localización celular del GLUT4 está altamente relacionada con el tráfico vesicular intracelular. La familia de las GTP-asas pequeñas Rab (Rab4, Rab8, Rab 11), han sido descritas como reguladores críticos de varias etapas del tráfico celular, incluyendo la translocación del GLUT4 [44]. Necesariamente para realizar esta acción, las proteínas de la familia Rab necesitan una modificación post-traducciona para ser activas, como es la prenilación. La expresión en células, de proteínas mutantes Rab4 (las cuales no pueden ser preniladas), previene la translocación del GLUT4. Sin embargo, también se inhibe la activación de señales tempranas en la cascada de señalización de insulina como es la activación de IRS, PI3K y especialmente, Akt [45]. Por lo tanto, cabe preguntarse si el calcio intracelular estaría participando en la prenilación de Rab4, ya que el uso de BAPTA-AM, afecta sin distinción, la activación de Akt y la translocación del transportador GLUT4.

7.3. Participación del calcio en la activación de Akt inducida por insulina

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se pudo establecer que el calcio, ya sea intracelular o extracelular, no afecta la fosforilación y consecuente activación del IR en respuesta a la unión de insulina. De manera importante, el calcio intracelular participa en la activación de proteína Akt en respuesta a insulina. El uso del quelante de calcio intracelular BAPTA-AM (50 μ M) disminuye drásticamente la fosforilación del residuo Ser473 de Akt en respuesta a insulina, afectando posteriormente la translocación del transportador GLUT4 y el transporte de glucosa inducido por insulina.

Cabe resguardar, que esta ausencia de calcio intracelular no altera el funcionamiento normal de las células, ya que otras proteínas río abajo del receptor de insulina, como son ERK 1/2, son activadas normalmente, además presentando un patrón de fosforilación diferente a Akt, dando cuenta de la acción diferencial y específica de la ausencia de calcio provocada por el uso de BAPTA-AM. En resumen, se puede establecer una relación directa entre la participación del calcio intracelular en la activación de proteína Akt dependiente de insulina y la translocación del transportador GLUT4 y posterior transporte de glucosa.

En adipocitos 3T3-L1, se demostró que BAPTA-AM, no disminuye la fosforilación de IR, ni tampoco de IRS 1/2, pero si reduce la fosforilación de Akt [38]. Más adelante, se estudió que el uso BAPTA-AM, reduce la fosforilación en el residuo Thr308 y también en Ser473, dependientes de insulina. Sin embargo, la actividad de PDK1 no se alteró por el uso de BAPTA-AM [46], por lo que las señales río arriba de Akt, no se han visto afectadas por la ausencia de calcio intracelular. Esto da cuenta que el calcio intracelular estaría afectando directamente la activación de Akt dependiente de insulina.

Futuros estudios deberían determinar cuáles son las señales específicas de calcio que estarían participando en la activación de Akt. Se puede postular que la E3 ligasa TRAF6, la cual ubiquitina a Akt, podría verse afectada por la disminución del calcio, ya sea por un mecanismo indirecto o un mecanismo directo donde el Ca^{2+} sea necesario para su funcionamiento.

Además hay que considerar que recientemente se ha postulado un nuevo mecanismo de regulación de Akt, el cual incluye la participación de la proteína deacetilasa SIRT1 [47], por lo que nuevas posibilidades se abren para encontrar mecanismos dependientes de calcio en la regulación de Akt.

7.4. Participación de reservorios específicos de calcio dependientes de IP₃R y RyR en la acción de insulina

Nuestro Laboratorio, previamente ha demostrado en cardiomiocitos neonatos, que insulina aumenta la liberación de calcio dependiente de IP₃R para regular el transporte de glucosa, a través de la modulación de Akt [48]. Sin embargo, en el músculo esquelético, un importante actor en la mantención de la homeostasis de la glucosa, no se habían realizado estudios que relacionaran la participación de IP₃R en la acción de insulina.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la participación de IP₃R en la activación de Akt. El bloqueo específico de IP₃R, evidenciado por el uso de xestospongina B disminuyó significativamente la fosforilación de la serina/treonina kinasa Akt en respuesta a insulina. Por otro lado, el bloqueo del RyR por el alcaloide vegetal Ryanodina no afectó significativamente la activación de IR, ni las proteínas río abajo, como son Akt y ERK 1/2. En el caso de las proteínas ERK 1/2, la activación de ERK 1 tiende a disminuir con la incubación de xestospongina B, mientras que la fosforilación de ERK 2 se mantiene estadísticamente invariable bajo las condiciones experimentales dadas.

Además, la disminución de la producción de IP_3 , mediante el uso de U-73122 (inhibidor de PLC) o el bloqueo de IP_3R , mediante la incubación de Xestospongina B, disminuyeron significativamente la translocación del transportador de glucosa GLUT4 en respuesta a insulina. Además, se apreció mediante inmunofluorescencia que el bloqueo de IP_3R también afecta la reorganización de actina, acción necesaria para la translocación del transportador GLUT4 hacia la membrana. Por otro lado, se obtuvo una leve disminución de la translocación del GLUT4 con el uso de Ryanodina, lo que no se observó sobre la fosforilación de Akt. Se obtuvieron resultados similares evaluando el transporte de glucosa en estas condiciones experimentales.

La participación de liberación de calcio dependiente de RyR en la translocación y transporte de glucosa dependiente de insulina, no ha sido reportada anteriormente. En el músculo esquelético, la liberación de calcio a través de RyR es causada por una interacción proteína-proteína con el canal de calcio tipo L [49].

Sin embargo, ha sido objeto de estudio la liberación de calcio a partir del RyR, mediante modificaciones químicas post-traduccionales en respuesta a especies reactivas del oxígeno (ROS) como poli-S-nitrosilación [50]. Específicamente en el músculo esquelético se ha encontrado que la NADPH oxidasa, una fuente de ROS en la célula, estimula la liberación de calcio del RyR, mediante S-glutationilación [51]. Existen reportes de que insulina promueve un aumento de calcio mediante IP_3R a través de la acción de la NADPH oxidasa y H_2O_2 [52].

Por lo tanto, en el músculo esquelético, insulina podría promover la translocación del transportador GLUT4 y transporte de glucosa, a través de la liberación de calcio a partir del RyR, mediante la producción de ROS y modificación química de este canal de calcio. Tampoco hay que descartar que exista liberación de calcio-inducida por calcio (CICR), desde IP₃R hacia el RyR, lo cual explicaría la participación del RyR en la translocación del GLUT4 en respuesta a insulina.

Nuestros resultados han vinculado fuertemente a IP₃R en la acción de insulina. Dentro de los antecedentes que se manejan, se ha observado en cardiomiocitos de ratones obesos (ratones ob/ob) que existe una alteración en la liberación de calcio mediada por insulina e IP₃, lo que afecta el manejo del calcio mitocondrial [53]. Se desprende de este trabajo que fisiológicamente insulina podría promover sus acciones a través de la liberación de calcio desde el receptor de IP₃. Además en patologías como la diabetes mellitus, podría estar alterado este proceso. Otro punto a rescatar es que una falla en la liberación de calcio por IP₃R, genera una disfunción en el manejo del calcio mitocondrial.

El trabajo de *Cárdenas, C. et al.* [54] describe que el traspaso de calcio desde el retículo endoplásmico (ER) hacia la mitocondria requiere del IP₃R, el cual es esencial para mantener funcionando correctamente los procesos bioenergéticos de la célula. Además el calcio liberado por la acción de IP₃, participa activamente en el metabolismo mitocondrial, a través de la activación de la piruvato deshidrogenasa (PDH). Un knockout del receptor de IP₃, aumenta los niveles de autofagia en las células, como mecanismo compensatorio para obtener energía.

Por lo tanto, el receptor de IP₃ es un importante regulador del estado bioenergético de la célula, ya que mediante la acción de insulina participa en la entrada de glucosa a través del transportador GLUT4, y también modula el metabolismo de la célula, a través de la regulación de enzimas mitocondriales. Se ha postulado la regulación de la liberación de Ca²⁺ a través del IP₃R mediante fosforilación y desfosforilación reversible [55]. Además, hay que considerar que existe un dominio de consenso en la secuencia del receptor de IP₃, la cual puede ser fosforilada por la proteína kinasa Akt [56].

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos en esta tesis, se puede concluir que IP₃R participa activamente en la acción de insulina. Esta hormona mediante la liberación de calcio a través de IP₃R promueve la fosforilación y activación de Akt, provocando la translocación del transportador GLUT4 a la membrana plasmática, y finalmente, aumentando el transporte de glucosa. Además, Insulina mediante la producción de IP₃, modula la reorganización de actina, acción necesaria para la translocación del transportador GLUT4 hacia la membrana, y por lo tanto, el transporte de glucosa.

Por otro lado, el bloqueo de RyR disminuye parcialmente la translocación y por consiguiente el transporte de glucosa, dando un nuevo papel al RyR en la acción de insulina. En síntesis, estos resultados dan una participación clave al calcio como segundo mensajero en la acción de insulina.

8. CONCLUSIONES

- El calcio intracelular participa activamente en el transporte de glucosa en respuesta a insulina. BAPTA-AM, un quelante de calcio intracelular, disminuyó la incorporación de glucosa de manera dependiente de la concentración.
- Específicamente, el calcio intracelular participa en la translocación del transportador GLUT4, ya que BAPTA-AM y la expresión de PV-NES-DsRed, disminuyen significativamente los niveles de transportador en superficie. A su vez, la reorganización de la actina cortical, un proceso necesario para la translocación del GLUT4 en respuesta a insulina, fue inhibido por la ausencia de calcio intracelular.
- La fosforilación de Akt en el residuo Ser473 en respuesta a insulina es fuertemente reducida por la ausencia de calcio intracelular.
- El bloqueo farmacológico de IP₃R, mediante Xestospongina B, disminuye parcialmente la fosforilación de Akt dependiente de insulina. Ryanodina, usada como antagonista del RyR, no alteró la fosforilación de Akt.
- La translocación del transportador GLUT4 hacia la membrana, disminuyó significativamente por Xestospongina B. El bloqueo de IP₃R, también inhibe el remodelamiento de la actina inducido por insulina. Consecuentemente, el transporte de glucosa también se redujo por Xestospongina B.
- Finalmente, los resultados obtenidos indican que insulina, a través del receptor de IP₃, regula la activación de la proteína kinasa Akt y modula la reorganización de la actina cortical, procesos indispensables para la translocación del transportador GLUT4, y por lo tanto, para el transporte de glucosa, en el músculo esquelético.

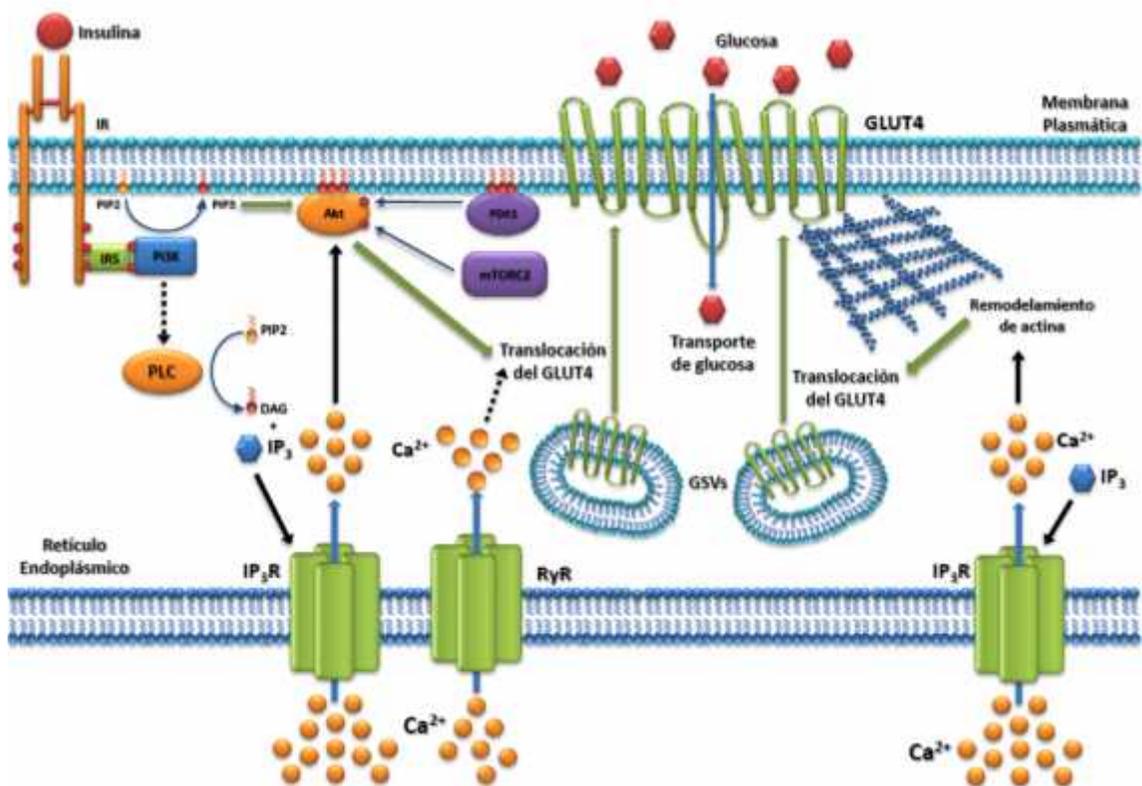


Figura 12. Modelo propuesto para la participación de la vía IP₃-IP₃R-Ca²⁺ en la acción de insulina en células musculares esqueléticas

Insulina mediante la participación del calcio intracelular promueve el transporte de glucosa en células musculares esqueléticas. La figura muestra como insulina a través de la liberación de calcio dependiente del IP₃R regula la activación de Akt y el remodelamiento de actina cortical, procesos claves para la translocación del GLUT4, y por consiguiente, para el transporte de glucosa. Además, se muestra la posible participación del RyR en la translocación del transportador de glucosa GLUT4, y por lo tanto, en el transporte de glucosa en las células musculares esqueléticas.

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] RYLE AP, SANGER F, SMITH LF, & KITAI R (1955) The disulphide bonds of insulin. *Biochem. J*, **60**, 541-556.
- [2] Mayer JP, Zhang F, & DiMarchi RD (2007) Insulin structure and function. *Biopolymers*, **88**, 687-713.
- [3] Weiss MA, Hua QX, Jia W, Chu YC, Wang RY, & Katsoyannis PG (2000) Hierarchical protein "un-design": insulin's intrachain disulfide bridge tethers a recognition alpha-helix. *Biochemistry*, **39**, 15429-15440.
- [4] Ohara-Imaizumi M & Nagamatsu S (2006) Insulin exocytotic mechanism by imaging technique. *J Biochem.*, **140**, 1-5.
- [5] Johnson JH, Newgard CB, Milburn JL, Lodish HF, & Thorens B (1990) The high Km glucose transporter of islets of Langerhans is functionally similar to the low affinity transporter of liver and has an identical primary sequence. *J Biol. Chem.*, **265**, 6548-6551.
- [6] Ghosh A, Ronner P, Cheong E, Khalid P, & Matschinsky FM (1991) The role of ATP and free ADP in metabolic coupling during fuel-stimulated insulin release from islet beta-cells in the isolated perfused rat pancreas. *J Biol. Chem.*, **266**, 22887-22892.
- [7] Tarasov A, Dusonchet J, & Ashcroft F (2004) Metabolic regulation of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K⁺ channel: a pas de deux. *Diabetes*, **53 Suppl 3**, S113-S122.
- [8] Rorsman P (1997) The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia*, **40**, 487-495.
- [9] Wang PR & Chien YW (1996) Day-night differences in the kinetics and dynamics of insulin: diabetic versus normal Yucatan minipigs. *Chronobiol. Int.*, **13**, 213-225.
- [10] De MP (2008) The insulin receptor: a prototype for dimeric, allosteric membrane receptors? *Trends Biochem. Sci.*, **33**, 376-384.
- [11] Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, & Vigneri R (2009) Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr. Rev.*, **30**, 586-623.
- [12] Taniguchi CM, Emanuelli B, & Kahn CR (2006) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 85-96.

- [13] Myers MG, Jr., Backer JM, Sun XJ, Shoelson S, Hu P, Schlessinger J, Yoakim M, Schaffhausen B, & White MF (1992) IRS-1 activates phosphatidylinositol 3¹-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **89**, 10350-10354.
- [14] Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, & Cohen P (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr. Biol.*, **7**, 261-269.
- [15] Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, & Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, **307**, 1098-1101.
- [16] Yang WL, Wang J, Chan CH, Lee SW, Campos AD, Lamothe B, Hur L, Grabiner BC, Lin X, Darnay BG, & Lin HK (2009) The E3 ligase TRAF6 regulates Akt ubiquitination and activation. *Science*, **325**, 1134-1138.
- [17] Sano H, Kane S, Sano E, Miinea CP, Asara JM, Lane WS, Garner CW, & Lienhard GE (2003) Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol. Chem.*, **278**, 14599-14602.
- [18] Sun Y, Bilan PJ, Liu Z, & Klip A (2010) Rab8A and Rab13 are activated by insulin and regulate GLUT4 translocation in muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **107**, 19909-19914.
- [19] Joost HG & Thorens B (2001) The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol. Membr. Biol.*, **18**, 247-256.
- [20] Hruz PW & Mueckler MM (2001) Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter (review). *Mol. Membr. Biol.*, **18**, 183-193.
- [21] Czech MP & Corvera S (1999) Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol. Chem.*, **274**, 1865-1868.
- [22] Hou JC & Pessin JE (2007) Ins (endocytosis) and outs (exocytosis) of GLUT4 trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **19**, 466-473.
- [23] Holman GD & Sandoval IV (2001) Moving the insulin-regulated glucose transporter GLUT4 into and out of storage. *Trends Cell Biol.*, **11**, 173-179.
- [24] Al-Hasani H, Kunamneni RK, Dawson K, Hinck CS, Muller-Wieland D, & Cushman SW (2002) Roles of the N- and C-termini of GLUT4 in endocytosis. *J Cell Sci.*, **115**, 131-140.

- [25] Corvera S, Chawla A, Chakrabarti R, Joly M, Buxton J, & Czech MP (1994) A double leucine within the GLUT4 glucose transporter COOH-terminal domain functions as an endocytosis signal. *J Cell Biol.*, **126**, 1625.
- [26] Chiu TT, Jensen TE, Sylow L, Richter EA, & Klip A (2011) Rac1 signalling towards GLUT4/glucose uptake in skeletal muscle. *Cell Signal.*, **23**, 1546-1554.
- [27] Rossetti L, Stenbit AE, Chen W, Hu M, Barzilai N, Katz EB, & Charron MJ (1997) Peripheral but not hepatic insulin resistance in mice with one disrupted allele of the glucose transporter type 4 (GLUT4) gene. *J Clin. Invest.*, **100**, 1831-1839.
- [28] Berridge MJ (2009) Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta*, **1793**, 933-940.
- [29] Maeda N, Kawasaki T, Nakade S, Yokota N, Taguchi T, Kasai M, & Mikoshiba K (1991) Structural and functional characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel from mouse cerebellum. *J Biol. Chem.*, **266**, 1109-1116.
- [30] Ross CA, Meldolesi J, Milner TA, Satoh T, Supattapone S, & Snyder SH (1989) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor localized to endoplasmic reticulum in cerebellar Purkinje neurons. *Nature*, **339**, 468-470.
- [31] Alvarez J & Montero M (2002) Measuring [Ca²⁺] in the endoplasmic reticulum with aequorin. *Cell Calcium*, **32**, 251-260.
- [32] Naraghi M & Neher E (1997) Linearized buffered Ca²⁺ diffusion in microdomains and its implications for calculation of [Ca²⁺] at the mouth of a calcium channel. *J Neurosci.*, **17**, 6961-6973.
- [33] Yaffe D & Saxel O (1977) A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation*, **7**, 159-166.
- [34] Wood IS, Wang B, Lorente-Cebrian S, & Trayhurn P (2007) Hypoxia increases expression of selective facilitative glucose transporters (GLUT) and 2-deoxy-D-glucose uptake in human adipocytes. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **361**, 468-473.
- [35] Schudt C, Gaertner U, & Pette D (1976) Insulin action on glucose transport and calcium fluxes in developing muscle cells in vitro. *Eur. J Biochem.*, **68**, 103-111.
- [36] Bruton JD, Katz A, & Westerblad H (1999) Insulin increases near-membrane but not global Ca²⁺ in isolated skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 3281-3286.

- [37] Lanner JT, Katz A, Tavi P, Sandstrom ME, Zhang SJ, Wretman C, James S, Fauconnier J, Lannergren J, Bruton JD, & Westerblad H (2006) The role of Ca²⁺ influx for insulin-mediated glucose uptake in skeletal muscle. *Diabetes*, **55**, 2077-2083.
- [38] Whitehead JP, Molero JC, Clark S, Martin S, Meneilly G, & James DE (2001) The role of Ca²⁺ in insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 cells. *J Biol. Chem.*, **276**, 27816-27824.
- [39] Li Y, Wang P, Xu J, Gorelick F, Yamazaki H, Andrews N, & Desir GV (2007) Regulation of insulin secretion and GLUT4 trafficking by the calcium sensor synaptotagmin VII. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **362**, 658-664.
- [40] Yip MF, Ramm G, Larance M, Hoehn KL, Wagner MC, Guilhaus M, & James DE (2008) CaMKII-mediated phosphorylation of the myosin motor Myo1c is required for insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes. *Cell Metab*, **8**, 384-398.
- [41] Kanzaki M (2006) Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics. *Endocr. J*, **53**, 267-293.
- [42] Chiu TT, Patel N, Shaw AE, Bamburg JR, & Klip A (2010) Arp2/3- and cofilin-coordinated actin dynamics is required for insulin-mediated GLUT4 translocation to the surface of muscle cells. *Mol. Biol. Cell*, **21**, 3529-3539.
- [43] Wang Y, Shibasaki F, & Mizuno K (2005) Calcium signal-induced cofilin dephosphorylation is mediated by Slingshot via calcineurin. *J Biol. Chem.*, **280**, 12683-12689.
- [44] He A, Liu X, Liu L, Chang Y, & Fang F (2007) How many signals impinge on GLUT4 activation by insulin? *Cell Signal.*, **19**, 1-7.
- [45] Knight JB, Cao KT, Gibson GV, & Olson AL (2000) Expression of a prenylation-deficient Rab4 interferes with propagation of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Endocrinology*, **141**, 208-218.
- [46] Worrall DS & Olefsky JM (2002) The effects of intracellular calcium depletion on insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Endocrinol*, **16**, 378-389.
- [47] Sundaresan NR, Pillai VB, Wolfgeher D, Samant S, Vasudevan P, Parekh V, Raghuraman H, Cunningham JM, Gupta M, & Gupta MP (2011) The Deacetylase SIRT1 Promotes Membrane Localization and Activation of Akt and PDK1 During Tumorigenesis and Cardiac Hypertrophy. *Sci. Signal.*, **4**, ra46.

- [48] Contreras-Ferrat AE, Toro B, Bravo R, Parra V, Vasquez C, Ibarra C, Mears D, Chiong M, Jaimovich E, Klip A, & Lavandero S (2010) An inositol 1,4,5-triphosphate (IP3)-IP3 receptor pathway is required for insulin-stimulated glucose transporter 4 translocation and glucose uptake in cardiomyocytes. *Endocrinology*, **151**, 4665-4677.
- [49] Endo M (2009) Calcium-induced calcium release in skeletal muscle. *Physiol Rev.*, **89**, 1153-1176.
- [50] Gonzalez DR, Treuer A, Sun QA, Stamler JS, & Hare JM (2009) S-Nitrosylation of cardiac ion channels. *J Cardiovasc Pharmacol.*, **54**, 188-195.
- [51] Hidalgo C, Sanchez G, Barrientos G, & Aracena-Parks P (2006) A transverse tubule NADPH oxidase activity stimulates calcium release from isolated triads via ryanodine receptor type 1 S -glutathionylation. *J Biol. Chem.*, **281**, 26473-26482.
- [52] Espinosa A, Garcia A, Hartel S, Hidalgo C, & Jaimovich E (2009) NADPH oxidase and hydrogen peroxide mediate insulin-induced calcium increase in skeletal muscle cells. *J Biol. Chem.*, **284**, 2568-2575.
- [53] Fauconnier J, Lanner JT, Zhang SJ, Tavi P, Bruton JD, Katz A, & Westerblad H (2005) Insulin and inositol 1,4,5-trisphosphate trigger abnormal cytosolic Ca²⁺ transients and reveal mitochondrial Ca²⁺ handling defects in cardiomyocytes of ob/ob mice. *Diabetes*, **54**, 2375-2381.
- [54] Cardenas C, Miller RA, Smith I, Bui T, Molgo J, Muller M, Vais H, Cheung KH, Yang J, Parker I, Thompson CB, Birnbaum MJ, Hallows KR, & Foscett JK (2010) Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca²⁺ transfer to mitochondria. *Cell*, **142**, 270-283.
- [55] Vanderheyden V, Devogelaere B, Missiaen L, De SH, Bultynck G, & Parys JB (2009) Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release by reversible phosphorylation and dephosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1793**, 959-970.
- [56] Khan MT, Wagner L, Yule DI, Bhanumathy C, & Joseph SK (2006) Akt kinase phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J Biol. Chem.*, **281**, 3731-3737.